



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Nuevos receptores macrocíclicos
orgánicos con resposta a estímulos**

**Novos receptores macrocíclicos
orgánicos con resposta a estímulos**

New stimuli-responsive organic macrocyclic receptors

Alejandro Fiel Baña

Curso: 2021 - 2022. Convocatoria: Febreiro

*Directores: Marcos Daniel García Romero
Carlos Peinador Veira*

AGRADECIMIENTOS

A mis directores Marcos D. García Romero y Carlos Peinador Veira, por la oportunidad de realizar este interesante trabajo y su orientación y apoyo constante.

A los miembros del grupo QUIMOLMAT 5. A Iago y a Lili, por enseñarme desde el principio el nuevo mundo del laboratorio, su ayuda y por hacer el día a día más llevadero. A Arturo, por su cercanía, paciencia y consejos con los que he aprendido mucho.

A mis compañeros y amigos del grado, en especial a Carol, Gabo, Irene, Lara, Lorena, Nerea y Yolanda, por todos los momentos compartidos en esta etapa, dentro y fuera de la facultad.

A mi familia, por ayudarme siempre.

RESUMEN

La síntesis de nuevos receptores despierta un gran interés dentro del área de la química supramolecular. Sus aplicaciones son numerosas y versátiles, en campos tan distintos como la biomedicina o el desarrollo de máquinas moleculares. La incorporación a estos sistemas de capacidad de autoensamblaje o respuesta a estímulos, expande sus posibilidades, permitiendo la construcción eficiente de estructuras más complejas.

El macrociclo "Blue Box" es uno de los receptores más estudiados de la química supramolecular. Su estructura es idónea para reconocer sustratos aromáticos con sistemas π excedentes en carga. Sin embargo, su síntesis es muy ineficiente. Por ello, se han diseñado diferentes sistemas análogos, que haciendo uso de la química covalente dinámica de iminas, combinan una preparación más sencilla, con una mayor complejidad estructural y funcional. Es el caso de los macrociclos "White Box" y "Red Box".

Este trabajo se centra en la síntesis de un nuevo receptor basado en la "Red Box", pero con una cavidad mayor al tener dos grupos fenilos extra. La síntesis es llevada a cabo en medio acuoso con buen rendimiento, debido a la inusual estabilidad cinética del enlace imínico de esta familia de receptores. Además, se estudian algunas de sus propiedades moleculares y supramoleculares. Presenta una marcada respuesta al pH y es capaz de reconocer sustratos aromáticos π excedentes en carga.

PALABRAS CLAVE

Química supramolecular, receptor-sustrato, química covalente dinámica, iminas, macrociclos, interruptor molecular, complejo de inclusión.

RESUMO

A síntese de novos receptores xera moito interese dentro do eido da química supramolecular. As súas aplicacións son numerosas e versátiles, en campos tan distintos como a biomedicina ou o desenvolvemento de máquinas moleculares. A incorporación a estes sistemas de capacidade de autoensamblaxe ou resposta a estímulos, expande as súas posibilidades permitindo a construción eficiente de estruturas máis complexas.

O macrociclo “Blue Box” é un dos receptores máis estudados da química supramolecular. A súa estrutura é idónea para recoñecer substratos aromáticos con sistemas π excedentes en carga. Con todo, a súa síntese é moi ineficiente. Por iso, deseñáronse diferentes sistemas análogos que facendo uso da química covalente dinámica de iminas, combinan unha preparación máis sinxela, cunha maior complexidade estrutural e funcional. É o caso dos macrociclos “White Box” e “Red Box”.

Este traballo centrase na síntese dun novo receptor baseado na “Red Box”, pero cunha cavidade maior ao ter dous grupos fenilos extra. A síntese é levada a cabo en medio acuoso cun bo rendemento, debido á extraordinaria estabilidade cinética do enlace imínico desta familia de receptores. Ademais, estúdanse algunha das súas propiedades moleculares e supramoleculares. Presenta unha marcada resposta ao pH e pode recoñecer substratos aromáticos π excedentes en carga.

PALABRAS CHAVE

Química supramolecular, receptor-substrato, química covalente dinámica, iminas, macrociclos, interruptor molecular, complexo de inclusión.

ABSTRACT

The synthesis of new receptors has a great interest in the field of supramolecular chemistry. Its applications are numerous and versatile, in fields as diverse as biomedicine or the development of molecular machines. The incorporation of self-assembly capacity or response to stimuli into these systems expands their possibilities, allowing the efficient construction of more complex structures.

The “Blue Box” macrocycle is one of the most studied receptors in supramolecular chemistry. Its structure is ideal for recognizing electron-rich π aromatic substrates. However, its synthesis is very inefficient. For this reason, different analogous systems have been designed using the dynamic covalent chemistry of imines. They combine a simpler preparation with major structural and functional complexity. This is the case of the “White Box” and “Red Box” macrocycles.

This work focuses on the synthesis of a new receptor based on the “Red Box”. But in this case, it has two extra phenyl groups that result in a larger cavity. The synthesis is carried out in aqueous solvent with good yield, due to the unusual kinetic stability of the imine bond of this family of receptors. In addition, some of its molecular and supramolecular properties are studied. It presents a marked response to pH and is capable of recognizing aromatic π electron-rich substrates.

KEY WORDS

Supramolecular chemistry, host-guest, dynamic covalent chemistry, imines, macrocycle, molecular switch, inclusion complex

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

Δ	Calentamiento a reflujo
1,5-DHN	1,5-Dihidroinaftaleno
2,7-DHN	2,7-Dihidroinaftaleno
A	Absorbancia
C	Macro ciclo estudiado
COSY	Correlation spectroscopy (Espectroscopía de correlación)
d	Doblete
DA	Dialdehído
DAR	Dialdehído del macrociclo Red Box
DCvC	Dynamic Covalent Chemistry (química covalente dinámica)
dd	Doble doblete
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Mejora sin distorsión por transferencia de polarización)
DH	Dihidrazona
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Correlación heteronuclear de enlace múltiple)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation (Correlación heteronuclear de un único cuanto)
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>K_a</i>	Constante de equilibrio ácido-base
m	Multiplete
m/z	Relación masa/carga
MIMs	Mechanically Interlocked Molecules (Moléculas enlazadas mecánicamente)
ppm	Partes por millón
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
s	Singlete
S _N 2	Sustitución Nucleófila Bimolecular
TBAI	Tetrabutylammonium iodide (ioduro de tertrabutilamonio)
TFA	Ácido trifluoroacético
T _R	Tiempo de retención
UV-Vis	Ultravioleta-visible
δ	Desplazamiento químico
ϵ	Coefficiente de absortividad molar

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. <i>La química supramolecular</i>	1
2. <i>Química receptor-sustrato</i>	2
3. <i>Receptores ciclofanos, ExBoxes y Blue Box</i>	4
4. <i>Control por estímulos externos</i>	6
5. <i>Química covalente dinámica</i>	8
6. <i>Química covalente dinámica de iminas</i>	11
7. <i>Antecedentes</i>	12
OBJETIVOS	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
1. <i>Síntesis de los componentes</i>	17
1.1 <i>Síntesis y caracterización del dialdehído (DA·2Br)</i>	17
1.3 <i>Síntesis y caracterización de la dihidrazona (DH·2Br)</i>	23
2. <i>Ensamblaje, caracterización y purificación del macrociclo C·4Br.</i>	25
3. <i>Respuesta del macrociclo a estímulos ácido-base</i>	30
3.1 <i>Comportamiento ácido-base</i>	30
3.2 <i>Estudio espectroscópico de las formas ácida y básica del macrociclo en disolución acuosa</i>	30
3.3 <i>Determinación espectrofotométrica del pKa del macrociclo</i>	32
4. <i>Formación de complejos de inclusión receptor-sustrato</i>	34
4.1 <i>Complejo de inclusión C⁴⁺⊂1,5-DHN</i>	34
5. <i>Experimento de la estabilidad cinética del macrociclo</i>	36
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	39
1. <i>Procedimientos generales</i>	39
2. <i>Síntesis de los componentes</i>	40
2.1 <i>Síntesis del dialdehído DA</i>	40
2.2 <i>Síntesis de la 4-hidracinopiridina hidrocloreuro</i>	40
2.3 <i>Síntesis de la dihidracina DH·2Br</i>	41
3. <i>Ensamblaje del macrociclo</i>	41
4. <i>Estudio espectroscópico del comportamiento ácido base del macrociclo C</i>	43
4.1 <i>Determinación de los coeficientes de absortividad molar ε para C⁴⁺ y C²⁺</i>	43
4.2 <i>Determinación de la constante de acidez pK_a del macrociclo C</i>	43
5. <i>Formación de complejos de inclusión</i>	43
6. <i>Experimento de la estabilidad cinética del macrociclo</i>	44
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXOS	53

INTRODUCCIÓN

1. La química supramolecular

“La química más allá de las moléculas”, así definió de forma coloquial la química supramolecular el premio nobel francés Jean Marie Lehn en 1978.^[1,2] A pesar de que esta definición puede resultar algo vaga y misteriosa expone de forma clara la idea de trascender al estudio de la química covalente de moléculas discretas para centrarse en las interacciones intermoleculares. El propio Lehn también la consideró como una suerte de “sociología química” en la que se estudia cómo las moléculas “se relacionan, se agrupan, se reconocen...”^[3] o incluso como esas agrupaciones responden a estímulos externos. En este sentido, diferentes moléculas se pueden agrupar para formar entidades complejas con propiedades que van más allá de la suma de las moléculas aisladas que la forman.^[4]

De esta forma, podemos considerar una supramolécula como “una entidad compleja y organizada que resulta de la asociación de dos o más especies mediante fuerzas intermoleculares no covalentes”.^[5] El conocimiento de estas interacciones es fundamental para el estudio de la química supramolecular, de las cuales podemos destacar: interacciones electroestáticas, enlace de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, efecto hidrófobo o interacciones π - π entre otras.^[6] Todas estas interacciones intermoleculares son desde el punto de vista energético más débiles que las covalentes, lo que hace de la química supramolecular una química dinámica por naturaleza. Debido a la reversibilidad de estas interacciones las distintas asociaciones moleculares pueden establecer equilibrios químicos de constitución y auto-ensamblaje donde los distintos componentes pueden reordenarse o cambiar su conectividad.^[1]

Aunque los orígenes de la química supramolecular tal y como está definida actualmente se remontan a finales de la década de 1960, sus raíces se asientan en conceptos desarrollados hace casi 100 años antes.^[7] Puede considerarse el principio de “lock and key” propuesto por Emil Fischer en 1894 para describir la interacción sustrato-enzima como el origen del “reconocimiento molecular”, siendo una de las ideas más importantes de la química supramolecular.^[4] En 1967 Charles J. Pedersen observa que los éteres corona muestran reconocimiento molecular al ser capaces de complejar cationes metálicos, convirtiéndose así en las primeras moléculas artificiales con esa capacidad.^[8] Más adelante Donald J. Cram desarrolla más este concepto para establecer la química “host-guest” como un nuevo campo que llevó a la creación de sofisticados contenedores orgánicos que sirven como receptores de pequeñas

moléculas orgánicas además de cationes metálicos. Pedersen, Cram y Lehn reciben juntos el premio nobel de química en el año 1987 por “el desarrollo y uso de moléculas que presentan interacciones dependientes de la estructura de alta selectividad”.

Desde entonces la química supramolecular ha experimentado un gran desarrollo pudiendo destacar el trabajo de Jean-Pierre Sauvage, J. Fraser Stoddart, y Bernard Feringa que recibieron el premio nobel de química en el año 2016 por “el diseño y síntesis de máquinas moleculares”.

2. Química receptor-sustrato

El reconocimiento molecular es probablemente una de las ideas más fundamentales de la química supramolecular. En un agregado receptor-sustrato una especie química, denominada sustrato, es reconocida e identificada selectivamente por otra denominada receptor mediante enlaces intermoleculares estableciéndose un equilibrio de asociación. El reconocimiento molecular y la química receptor-sustrato son empleados habitualmente como sinónimos.

El sustrato debe contener una colección de sitios de enlace y disposición estérica complementaria a la del receptor, es decir ambos deben ser “estereoelectrónicamente compatibles”.^[9] Por lo tanto, un sustrato que posea grupos dadores de enlace de hidrógeno será reconocido y compatible electrónicamente por un receptor con grupos aceptores de los mismos, de la misma forma que un sustrato ácido de Lewis será reconocido por un receptor base de Lewis. También es necesario que ambas moléculas sean estéricamente compatibles, para ello en la conformación de enlace el sustrato debe tener el suficiente espacio como para interaccionar eficazmente con los sitios de unión. Es decir, no se formará el complejo receptor-sustrato si el sustrato es demasiado grande para la cavidad del receptor. Asimismo, en la aproximación del sustrato a la cavidad del receptor no debe haber grupos funcionales que produzcan repulsiones que hagan cinéticamente inviable la formación del agregado.

Además de la complementariedad estereoelectrónica, otro aspecto fundamental en la formación de estructuras “Host-Guest” es la preorganización de los sitios de enlace del receptor.^[10] Se considera que un receptor tiene una elevada preorganización cuando no realiza cambios conformacionales significativos al formar el complejo con el sustrato. Al estar el receptor preorganizado la asociación es más favorable por no tener que realizar un gasto energético en modificar su estructura, pagando el precio entálpico de repulsiones desfavorables o de romper enlaces de solvatación. Este precio ya ha sido

“pagado” previamente en la síntesis del receptor, lo que hace que los receptores más preorganizados sean más difíciles de sintetizar, pero formen agregados mucho más estables.

Por ejemplo, como se muestra en la *Figura 1*, los éteres corona forman agregados hasta 10^4 veces más estables que los podandos, sus análogos lineales.^[2] En este caso el podando tiene pocas repulsiones entre los pares electrónicos libres y además está bien solvatado lo que hace más caro energéticamente que adopte la conformación de enlace. Por lo que, a pesar de tener el mismo tipo y el mismo número de sitios de enlace, el éter corona forma complejos mucho más estables al estar más preorganizado.

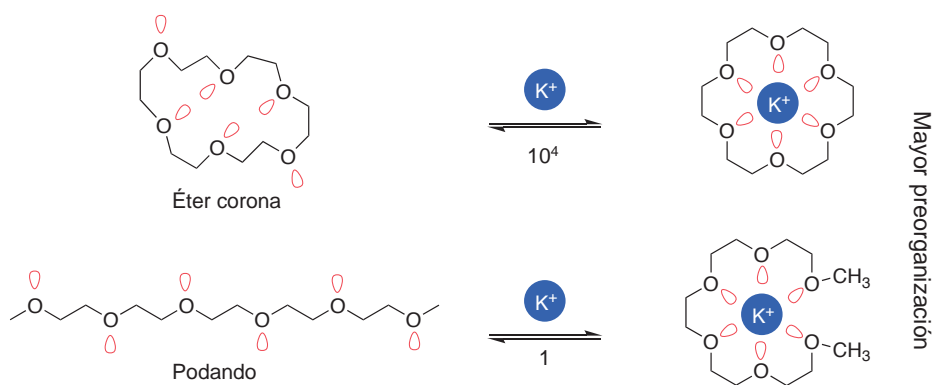


Figura 1. Comparación de equilibrios de asociación de un catión de potasio con un éter corona y un podando pentaetilenglicol dimetil éter

Es habitual considerar en un complejo receptor-sustrato al receptor (o host en inglés) como la molécula más grande y al sustrato (o guest en inglés) como la más pequeña.^[9] De un modo más formal se puede definir al receptor como la molécula del agregado en el que sus sitios de unión convergen, es decir se dirigen cara un mismo lugar. Mientras que el sustrato es aquel que sus sitios de enlace divergen, desde un punto común se enlazan cara direcciones distintas.^[11] De manera más gráfica, en la *Figura 2* se representa un agregado entre un éter corona y un catión metálico, desde el punto de vista del éter corona sus sitios de enlace convergen por lo tanto es el receptor y desde el punto de vista del catión, los enlaces divergen, por lo que es el sustrato.

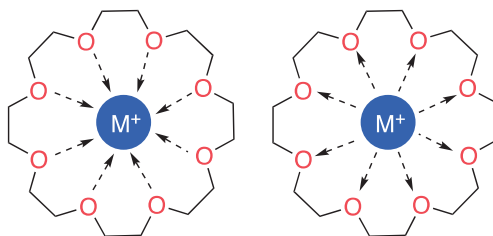


Figura 2. Convergencia y divergencia en un complejo Host-Guest entre un éter corona (receptor) y un catión metálico (sustrato)

Los receptores suelen ser desde el punto de vista estructural más complejos que los sustratos y son diseñados para ser capaces de reconocer a gran variedad de moléculas. Actualmente existe gran variedad de receptores, a modo de ejemplo podemos destacar las ciclodextrinas,^[12] los calixerenos^[13] o las “Exboxes”.^[14] La investigación de receptores sintéticos abre la puerta a numerosas aplicaciones prácticas como puede ser: la señalización, secuestro o separación de compuestos de interés, como fármacos o contaminantes;^[15] síntesis de enzimas artificiales;^[16] modificación farmacocinética, para la liberación controlada de fármacos;^[17] maquinas moleculares...^[18]

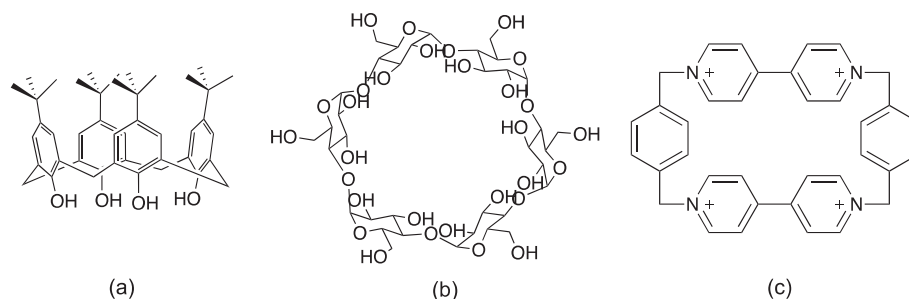


Figura 3. Ejemplos de receptores supramoleculares: (a) Calixereno (b) Ciclodextrina (c) ExBox (BlueBox)

3. Receptores ciclofanos, ExBoxes y Blue Box

Un ciclofano es por definición un macrociclo que contiene uno o más anillos aromáticos unidos por puentes alifáticos. Existe una gran variedad de ciclofanos sintéticos que actúan como receptores, y son capaces de formar complejos de inclusión con moléculas orgánicas, tanto en medio orgánico como en acuoso.^[2] Su estudio es de gran interés para la química supramolecular por ser moléculas con una gran preorganización y con numerosas posibilidades de configuraciones de sitios de enlace.^[19]

Existe una familia de receptores macrocíclicos denominados “Exboxes” que son ciclofanos policatiónicos basados en piridinio y fueron sintetizados por primera vez por el grupo de Fraser Stoddart. Al estar formados por unidades bipiridínicas alquiladas,

estas les confieren regiones deficientes en carga y una cavidad hidrofóbica. Con estas características son capaces de llevar a cabo reconocimiento de sustratos aromáticos excedentes en carga a través de interacciones tipo π - π y efecto hidrofóbico, siempre y cuando su tamaño y constitución electrónica se complementen de forma adecuada.^[20,21]

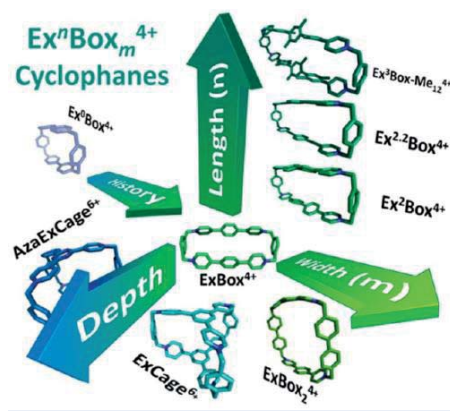


Figura 4. Ejemplos de diferentes ciclofanos de la familia ExBox^[20]

El derivado más simple desde el punto de vista estructural es el ciclofano ciclobis(paraquat-p-fenileno), más conocido como “Blue Box”. Está formado por dos unidades 4-4' bipiridinio unidas de extremo a extremo por conectores p-xileno (Figura 5). Fue desarrollada por Stoddart et al. en 1988,^[22] y es probablemente una de las moléculas más famosas de la química supramolecular.^[2]

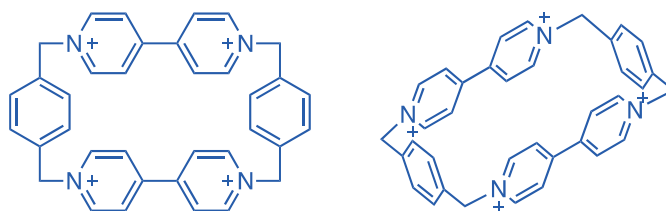


Figura 5. Estructura 2D y 3D del macrociclo “Blue Box”

Se trata de un macrociclo muy versátil, puede formar parte de numerosos agregados moleculares como catenanos o rotaxanos, piezas fundamentales de las denominadas MIMs (mechanically interlocked molecules) o máquinas moleculares.^[23] Además, al presentar una cavidad hidrofóbica en agua es un receptor ideal para sustratos con sistemas aromáticos π electro-excedentes.^[2,14] Como resultado de su estructura tiene accesibles dos estados redox, lo que se traduce en comportamiento distinto dependiendo del estado de oxidación del ciclofano.^[21,24]

La formación del complejo Host-Guest se realiza a través de distintos enlaces intermoleculares: (1) interacciones π dador - π aceptor, tienen lugar entre el anillo

electro-excedente del sustrato y los anillos electro-deficientes de la “Blue Box” a los que transfiere carga; (2) Interacciones $\text{CH}\cdots\pi$, en las que las nubes electrónicas de los anillos laterales p-xileno interaccionan con orientación perpendicular con los átomos de hidrógeno del sustrato; (3) efecto hidrofóbico, en el caso una disolución acuosa las moléculas de agua interaccionan mucho menos con un sustrato de carácter orgánico que con el resto de ellas, por lo que el sustrato tenderá a ser “expulsado” de la disolución introduciéndose en la cavidad hidrofóbica del receptor; (4) interacciones de tipo van der Waals que por supuesto, también están presentes.^[6,14]

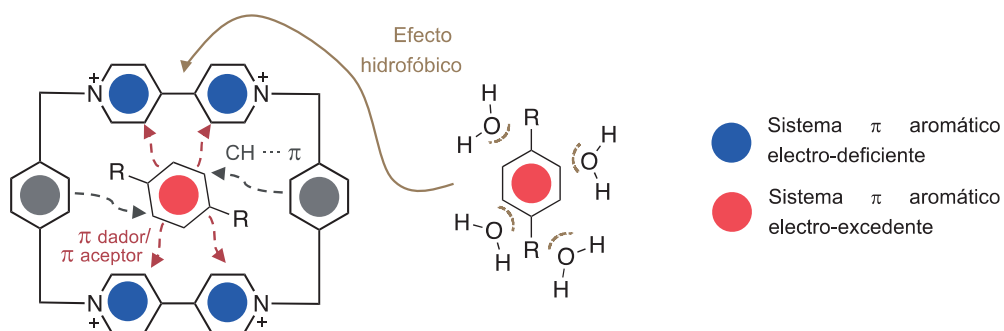


Figura 6. Representación de las interacciones más importantes en la formación de complejos receptor-sustrato entre la Blue Box y un sustrato aromático π electro-excedente.

4. Control por estímulos externos

Las estructuras supramoleculares están basadas en interacciones intermoleculares débiles que hacen que sean inherentemente dinámicas. En este sentido, la química supramolecular no solo busca construir nueva materia sino también poder controlar su comportamiento dinámico.^[21]

Los interruptores moleculares se definen como moléculas que, en respuesta a un estímulo externo, son capaces de intercambiarse entre dos o más estados estables. El estímulo externo usado varía en función del tipo de interruptor molecular, ejemplos de ellos pueden ser: modificación del pH, temperatura, añadir algún nuevo ligando, hacer incidir luz o aplicar una corriente eléctrica.^[25]

La síntesis de receptores con interruptores moleculares que modifiquen su estructura, abre la puerta al control de la formación de agregados receptor-sustrato. Lo que implica no solo tener receptores que consiguen reconocer a sustratos de forma selectiva, sino que además es posible realizar una captura o liberación controlada del sustrato por medio de un estímulo externo. Metafóricamente se podría considerar como una “caja molecular” que podemos decidir cuándo abrir y cerrar.

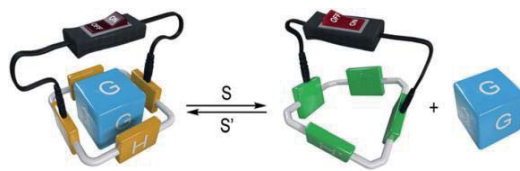


Figura 7. Representación esquemática de un hipotético receptor que contiene un interruptor molecular que al recibir un estímulo cambia su estructura liberando el sustrato.^[21]

Un ejemplo típico de este tipo de receptores con respuesta a estímulos sería la mencionada anteriormente “Blue Box”. Su estructura permite tener dos estados redox accesibles en los que cambian significativamente sus características estereo-electrónicas, lo que modifica su afinidad por diferentes tipos de sustratos. Como se muestra en la Figura 8, la “Blue Box” presenta diferentes formas de establecer complejos de inclusión en función de su estado de reducción: (1) en su forma tetracatiónica es capaz de formar complejos de inclusión con sustratos excedentes en carga, debido a la deficiencia en carga de los anillos del macrociclo; (2) en su forma diradical dicatiónica (1^{er} estado reducido) con sustratos radicales catiónicos por medio de interacciones “radical-pairing”;^[26] (3) en su estado neutro (2^o estado reducido) con sustratos deficientes en carga por medio de fuerzas de van der Waals. Es posible cambiar el estado de oxidación del ciclofano de forma electroquímica o por medio indirecto por “transferencia de electrones foto-inducida (PET)”. De esta forma, los cambios estructurales producidos de forma controlada y reversible en el macrociclo van más allá de la propia molécula al modificar su comportamiento supramolecular.^[21,24]

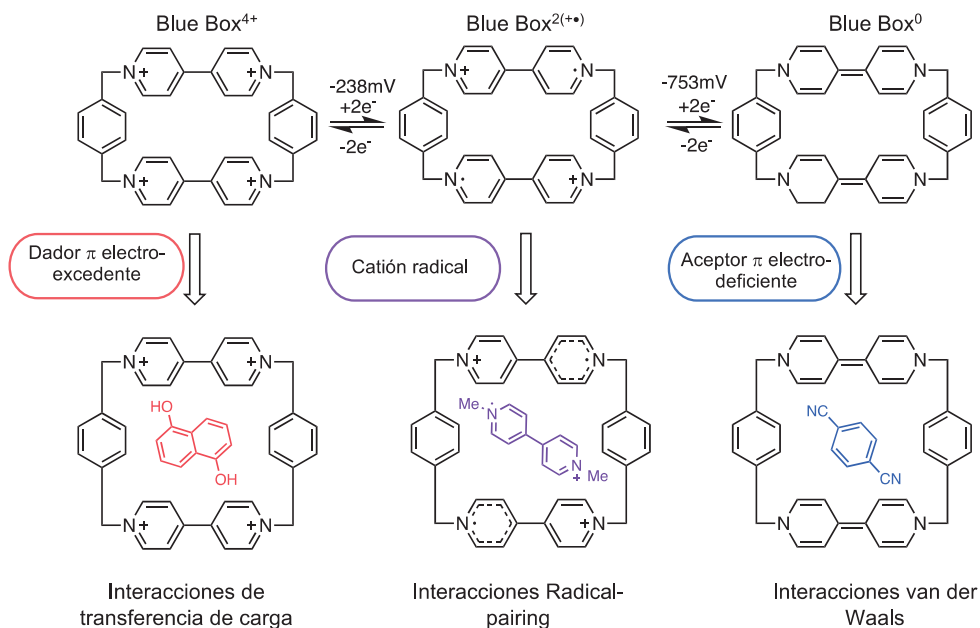


Figura 8. Diferentes complejos de inclusión de la "Blue Box" dependiendo de su estado de oxidación.

5. Química covalente dinámica

En los últimos doscientos años la química molecular ha desarrollado multitud de procedimientos para formar y deshacer enlaces covalentes de un modo preciso, permitiendo la síntesis de numerosas moléculas y materiales.^[27] Esta síntesis está dominada por reacciones de control cinético que resultan en la formación irreversible de los enlaces covalentes que tengan una menor energía de activación. De esta forma, se consiguen productos estables cinéticamente, que una vez formados no se reconvierten en materiales de partida o en otros productos.^[28]

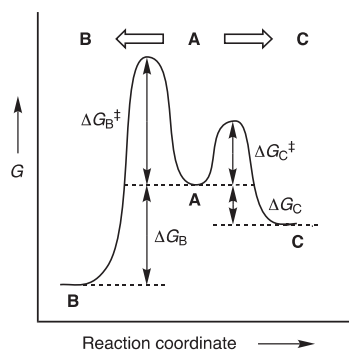


Figura 9. Perfil de energías libres para un producto obtenido bajo control termodinámico (B) y uno obtenido bajo control cinético (C)

En la química supramolecular, la síntesis de agregados moleculares o supramoléculas está guiada por enlaces intermoleculares formados bajo control termodinámico. Es decir, la estabilidad termodinámica relativa de los posibles productos es la que controla su proporción, estableciéndose un equilibrio entre ellos. Sin embargo, estos sistemas supramoleculares son poco estables cinéticamente, lo que en ocasiones hace difícil el aislamiento y estudio de los productos formados.

Como respuesta a ese problema, la química covalente dinámica (DCvC) surge de importar a nivel molecular el dinamismo de la supramolecular, englobando las reacciones basadas en la formación de enlaces covalentes reversibles bajo control termodinámico. Al tratarse de un sistema dinámico se puede producir una “corrección de errores” permitiendo que productos no deseados e inestables termodinámicamente, se puedan reconvertir en el equilibrio para llevar al sistema al mínimo termodinámico, aunque estén favorecidos por condiciones cinéticas al formarse más rápido.

Al tratarse de un sistema bajo control termodinámico es posible modificar el equilibrio cambiando las condiciones de la reacción, por lo que es considerada como una química adaptable.^[29] Para ello, se pueden modificar las concentraciones de los componentes agregando más material de partida o retirando producto. También, es posible introducir alguna característica que haga que un producto sea más estable como, por ejemplo, añadir alguna plantilla que lo estabilice formando un nuevo mínimo termodinámico que cambie la distribución del equilibrio (*Figura 10*).^[30]

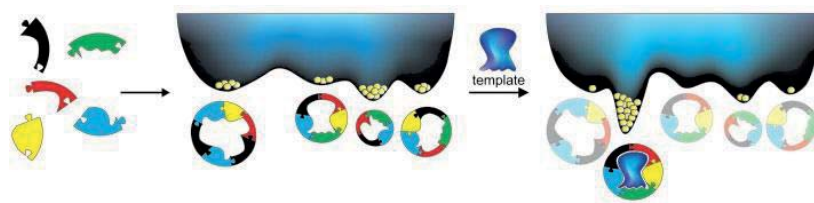


Figura 10. Ejemplo de síntesis de distintos receptores a partir de "building blocks" que se auto-ensamblan mediante DCvC. Al añadir una plantilla se redistribuirá el equilibrio favoreciendo al macrociclo que forme un agregado más estable.^[30]

Por lo tanto, las ventajas de los sistemas dinámicos se complementan con la estabilidad cinética que otorga la fortaleza de los enlaces covalentes. Sin embargo, existen algunas diferencias importantes entre los sistemas supramoleculares y los de química covalente dinámica. El proceso de equilibrio es más lento en el caso de la DCvC al tratarse de enlaces más fuertes, por lo que es habitual que se requiera algún tipo de catalizador que ayude al sistema a alcanzar el equilibrio en una escala de tiempo razonable. Además, también es importante que se pueda parar el equilibrio para aislar

los productos deseados, para ello de forma habitual se utilizan métodos como la eliminación del catalizador, control de temperatura o pH.^[29]

Aunque teóricamente en un sistema bajo control termodinámico la distribución de productos no depende de los caminos energéticos, en la práctica en ocasiones existen trampas cinéticas donde los productos no se reconvierten de nuevo en el equilibrio. Es el caso de intermedios insolubles o macrociclos que llevan a cabo más rápidamente su cierre intramolecular que interconversiones con otras especies. Aunque pueda parecer una desventaja, en algunos casos añadir elementos de control cinético al control termodinámico puede ser conveniente. De esta manera se expande la variedad de estructuras a las que se puede acceder usando el enlace covalente reversible, más allá de las que representan el puro mínimo termodinámico.^[28,29,31] Un buen ejemplo es el caso del macrociclo “Red Box” desarrollado por el grupo de García, Peinador et al.,^[32] que a pesar sintetizarse usando la química covalente dinámica de iminas, no se observa equilibrio de interconversión con otras especies al ser un producto cinéticamente atrapado por la inusual estabilidad de su enlace imina.

Se pueden diferenciar dos tipos de reacciones dentro de la DCvC: a) las que engloban la formación o rotura de un nuevo tipo de enlace covalente dando lugar a un producto de condensación y una pequeña molécula y b) las que son resultado de un intercambio directo donde el enlace covalente reversible es del mismo tipo tanto en los materiales de partida como en los productos.^[28]

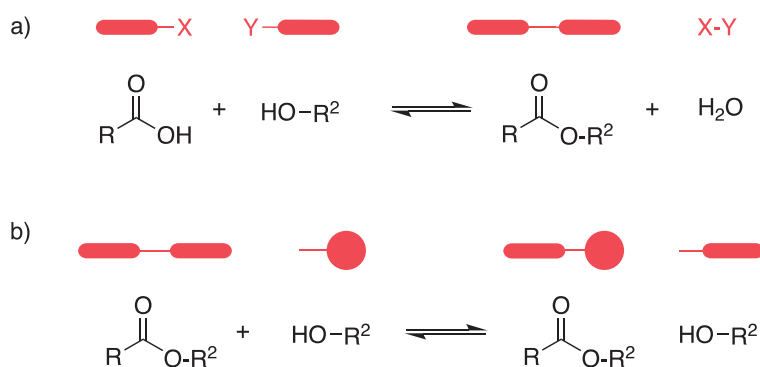


Figura 11. Ejemplo de dos tipos de reacciones de la química covalente dinámica.^[28]

6. Química covalente dinámica de iminas

El enlace imínico ha sido el enlace covalente más usado desde el comienzo de la DCvC, siendo usado en multitud de aplicaciones como la formación de agregados moleculares complejos, interruptores moleculares o maquinas moleculares.^[33] Además, este tipo de enlace es el utilizado para la síntesis del macrociclo estudiado en este trabajo por lo que es conveniente exponer brevemente sus características.

Las iminas son un grupo funcional análogo del carbonilo con la fórmula general que se muestra en la *Figura 12*. R¹, R² y R³ pueden ser un alquilo, un arilo o un hidrógeno. En el caso de que R³ sea cualquier sustituyente a excepción del hidrógeno el compuesto es considerado una “base de Schiff”.^[34]



Figura 12. Fórmula general de una imina

Las iminas están formadas a partir de la condensación del grupo carbonilo de un aldehído o cetona con una amina (*Figura 13*). Normalmente se lleva a cabo poniendo los materiales de partida a reflujo bajo condiciones azeotropicas. Aunque las iminas se pueden formar en condiciones neutras, es habitual añadir una cantidad catalítica de ácido para protonar el carbonilo haciéndolo más electrófilo.^[33] De esta forma, la amina realiza una adición nucleófila sobre el carbono electrófilo del carbonilo protonado dando lugar a un intermedio tetraédrico que colapsa liberando agua y la imina.

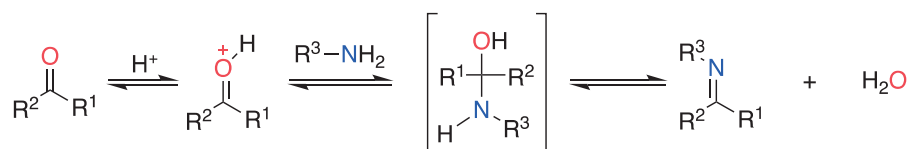


Figura 13. Equilibrio de formación de iminas

La reacción es reversible permitiendo desplazar el equilibrio variando las condiciones. De forma que, si queremos desplazar el equilibrio hacia la formación de la imina podemos retirar el agua liberada añadiendo un agente secante como el sulfato de magnesio (MgSO₄) o usando un aparato de Dean-Stark. Si, por consiguiente, deseamos romper el enlace imina desplazando el equilibrio a la izquierda bastará con añadir agua. De hecho, las iminas son uno de los pocos enlaces covalentes que pueden formarse y deshacerse reversiblemente de una manera tan eficiente. Sin embargo, es posible “fijar” la imina reduciendo el enlace C=N, de esta manera al parar el equilibrio se atrapan

cinéticamente productos obtenidos bajo control termodinámico. Aunque de esta forma desaparece el elemento de reversibilidad que hace tan especial a este tipo de enlaces.

Las hidrazonas con fórmula general mostrada en la *Figura 14* son estructuralmente muy parecidas a las iminas. En cambio, el efecto mesomérico o de resonancia hace que decrezca la electrofilia del carbono C=N de la hidrazona, por lo tanto, son mucho más estables frente la hidrólisis que sus análogos imina en presencia de agua. De hecho, son consideradas inertes en condiciones neutras, aunque con catálisis ácida son capaces de realizar las mismas reacciones que las iminas.^[34]

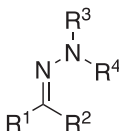


Figura 14. Fórmula general de las hidrazonas

7. Antecedentes

La síntesis de la ya mencionada ciclobis(paraquat-p-fenileno) o “Blue Box” consiste en dos reacciones S_N2 consecutivas bajo control cinético. Desde su primera síntesis en 1988,^[22] donde solo se consiguió aislar producto con un 12% de rendimiento, se ha tratado de modificar las condiciones para optimizar el proceso. En la búsqueda de producir la Blue Box o sus análogos ExBoxes de una manera rápida y eficiente, se ha probado a modificar el disolvente, la temperatura o la presión, además del uso de plantillas o catalizadores. Se han llegado a reportar rendimientos de entre 60% y 80% dependiendo de las condiciones y la plantilla y/o catalizador utilizado, siendo el TBAI (ioduro de tetrametilamonio) el más eficaz al promover el control termodinámico en la etapa clave de la ciclación S_N2 .^[14,35] Sin embargo, la necesidad de condiciones fuertes de reacción, o la adición de catalizadores o plantillas que dificulten la purificación del producto final, hace que sea deseable la búsqueda de nuevas estrategias de ensamblaje para la obtención de sistemas análogos a la Blue Box.^[36]

Es por ello, que el grupo QUIMOLMAT empezó a estudiar posibles receptores macrocíclicos inspirados en la Blue Box auto-ensamblados bajo control termodinámico. Esta estrategia no solo permite una síntesis más eficiente en condiciones suaves, sino que su carácter dinámico abre la puerta a la construcción de receptores autoensamblados con una mayor complejidad estructural. Es decir, al ser formados a partir de un equilibrio en el que diferentes “building blocks” se enlazan de forma reversible, se podría formar

el complejo receptor-sustrato más adecuado desplazando el equilibrio según las condiciones del sistema.

Siguiendo ese objetivo, en el año 2019 se consiguió desarrollar un análogo de la Blue Box utilizando la DCvC de iminas, la “White Box” (Figura 15). Este nuevo receptor se consiguió obtener bajo control termodinámico en agua bajo catálisis ácida a través de la formación de enlaces acil hidrazona. En la síntesis además emplearon un exceso de la molécula 2,7-DHN como plantilla para conseguir desplazar el equilibrio hacia la formación del macrociclo frente otras especies oligoméricas. La “White Box” posee una marcada respuesta al pH en agua debido a la acidez de los protones amida. Además, posee un comportamiento dual, con presencia de rotámeros en condiciones ácidas que hacen que tenga un comportamiento flexible mientras que en condiciones neutras/básicas presenta una estructura rígida.^[37]

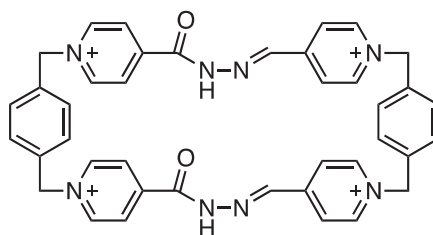


Figura 15. Estructura de la “White Box”.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la “White Box” se concluyó que podría ser interesante eliminar los grupos carbonilo de manera que la deslocalización del par electrónico de la amina tenga lugar solamente en los anillos piridínicos. Con esa idea surge la “Red Box” (Figura 16). Era esperable que tuviese unas características similares a la “White Box” en términos de estabilidad frente a hidrólisis, respuesta a pH y habilidad de complejación.

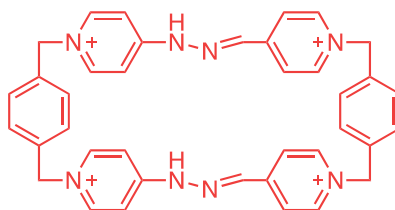


Figura 16. Estructura de la “Red Box”.

Sin embargo, la mayor capacidad de deslocalización hace que el enlace C=N sea mucho más estable de lo esperado, presentando una inusual estabilidad cinética al no observarse que los enlaces imina estén en equilibrio. De hecho, es el producto

mayoritario en agua con un gran rendimiento y sin necesidad de uso de plantilla. Una prueba de su estabilidad cinética se observa al mezclar la “White Box” con el building block dialdehído de la “Red Box”, donde no se establece un equilibrio dinámico entre las distintas especies, sino que se forma la “Red Box” de manera irreversible.^[32]

Presenta una marcada respuesta al pH como consecuencia a la gran deslocalización de los pares electrónicos libres de la amina a lo largo de ambas varillas. Además, en medio orgánico cuando no existe el efecto hidrofóbico, actúa como un interruptor molecular. Esto significa que forma complejos con sustratos en medio neutro o ácido, pero no en medio básico cuando el macrociclo está desprotonado. En esta forma sus anillos piridinos no son tan electro-deficientes como para hacer una interacción π - π efectiva. Por lo tanto, se puede controlar el equilibrio de formación del complejo receptor-sustrato modificando el pH del medio.

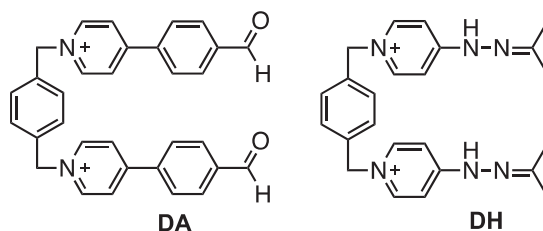
Los complejos formados son más estables que los de la “White Box” ya que posee una cavidad más compacta y con mayor carácter π lo que incrementa su habilidad de formar interacciones π - π .^[32]

En este trabajo se tomará como punto de partida la “Red Box” y se tratará de sintetizar un análogo suyo de mayor tamaño con un grupo fenilo más en cada una de las varillas.

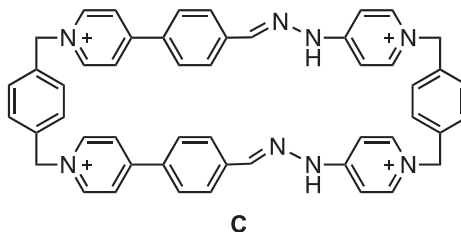
OBJETIVOS

Siguiendo la línea de investigación del grupo QUIMOLMAT de la búsqueda de receptores macrocíclicos similares a la “Blue Box” haciendo uso de la química covalente dinámica de iminas, este trabajo se centrará en la síntesis, purificación, caracterización y estudio de alguna de las propiedades de un macrociclo (**C**) equivalente a la “Red Box”, pero con un anillo fenilo extra en el componente del dialdehído.

1. Síntesis de los componentes o también denominados “building blocks” dialdehído **DA** y dihidrazona **DH**.



2. Ensamblaje del macrociclo **C**

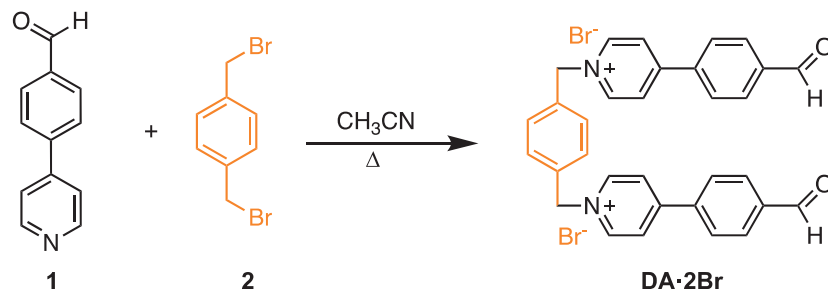


3. Purificación de **C** por medio de HPLC semipreparativa en fase reversa, y análisis de lo obtenido por medio de HPLC-MS.
4. Caracterización de todos los compuestos obtenidos mediante espectros RMN-¹H/¹³C mono y bidimensionales.
5. Estudio del comportamiento ácido-base del macrociclo **C** y determinación de sus constantes de absortividad molar en medio ácido y básico de sus bandas características. Así como determinar la constante de acidez pK_a .
6. Estudio del complejo de inclusión del macrociclo **C** con el 1,5 dihidroxinaftaleno.
7. Determinación de la estabilidad cinética del macrociclo **C** frente a otras especies.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Síntesis de los componentes

1.1 Síntesis y caracterización del dialdehído (DA·2Br)



Esquema 1. Síntesis del dialdehído DA

El primer paso para el ensamblaje del macrociclo es la síntesis de sus componentes o “building blocks” a partir de compuestos comerciales.

La síntesis del dialdehído (DA·Br) se llevó a cabo mediante una reacción S_N2 en la que el nitrógeno del 4-(piridin-4-il)benzaldehído ataca al 1,4-(dibromometil)benceno, obteniéndose el producto como sal de bromuro. Para confirmar y caracterizar la estructura del producto se empleó espectroscopía RMN-¹H/¹³C mono y bidimensional y espectroscopia de masas. Además, el procedimiento seguido para la elucidación estructural completa de esta molécula ha sido tomado como modelo para el resto de las moléculas analizadas.

En el espectro RMN-¹H (*Figura 17*) se observan siete señales correspondientes a los siete tipos de protones no equivalentes de la molécula. Cabe destacar que se trata de una molécula bastante simétrica. Además, existen señales muy poco intensas que se atribuyen al producto hidratado.

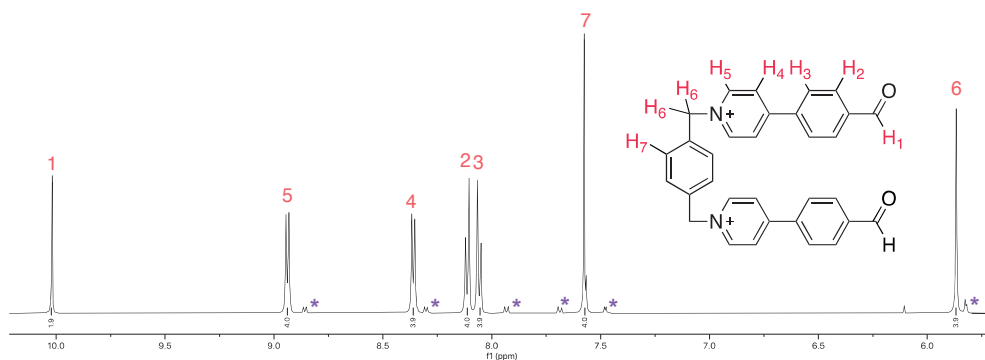


Figura 17. Espectro RMN- ^1H (D_2O , 500 MHz) de **DA**, los números indican la asignación de las señales. Los asteriscos indican las señales del aldehído hidratado

Para la asignación de las señales, en primer lugar, según el desplazamiento químico es fácil identificar el singlete de 10,1 ppm como el protón H_1 del aldehído, que además como es de esperar integra por 2H. Por otra parte, los protones metilos H_6 se corresponden a la señal más apantallada que se observa a 5,8 ppm. Se trata de un desplazamiento químico inusualmente alto para protones situados en carbonos sp^3 , pero es debido a que este carbono está enlazado al nitrógeno cargado positivamente del anillo piridínico, que le retira densidad electrónica desapantallando claramente su señal.

Se identifican cinco picos con desplazamiento químico de entre 6 y 9 ppm, el intervalo típico de los protones aromáticos. Es de esperar que, la señal más desapantallada (*pico* 5) corresponda a los protones H_5 en posición alfa al nitrógeno. De acuerdo a su multiplicidad se puede deducir que el singlete intenso que integra por 4H (*pico* 7), corresponda a los protones H_7 del p-xileno, ya que son los únicos protones aromáticos que no tienen protones vecinales magnéticamente diferentes con los que acoplarse.

El espectro RMN bidimensional COSY muestra la correlación ^1H - ^1H de los acoplamiento espín-espín (*Figura 18*). Las correlaciones que forman la diagonal del espectro no son relevantes ya que los protones están correlacionados consigo mismos. Los cruces fuera de la diagonal entre protones distintos nos indica qué protón se encuentra a dos enlaces. Se observa un cruce claro entre las señales 4 y 5, lo que indica que los protones que las generan están acoplados dando lugar a una multiplicidad de doblete. En base a la asignación de los protones H_5 , se puede deducir que al estar acoplados los protones H_4 serán aquellos en posición beta al nitrógeno del anillo piridino. La proximidad de las señales 2 y 3 hace que sea difícil distinguir el cruce entre ambas señales, aunque sí que están acopladas. Por descarte es esperable que sean las

señales del anillo del benzaldehído, se corroborará y asignará en base a los siguientes espectros.

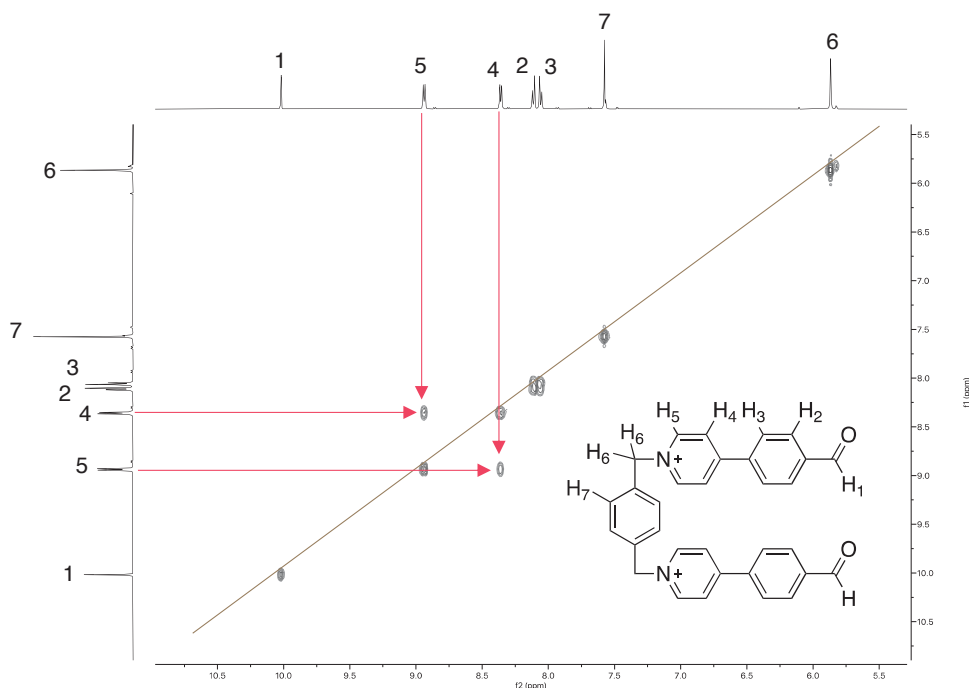


Figura 18. Espectro COSY (D_2O , 500 MHz) de **DA**. Las flechas indican las correlaciones entre las señales H_5 y H_4

En el espectro de RMN- ^{13}C se diferencian once señales. Para establecer una primera asignación es de gran ayuda el espectro DEPT (Figura 19), que por comparación es posible diferenciar entre carbonos primarios y terciarios (sus señales estarán en la misma fase, hacia arriba), secundarios (fase contraria, hacia abajo) y cuaternarios (señales desaparecerán).

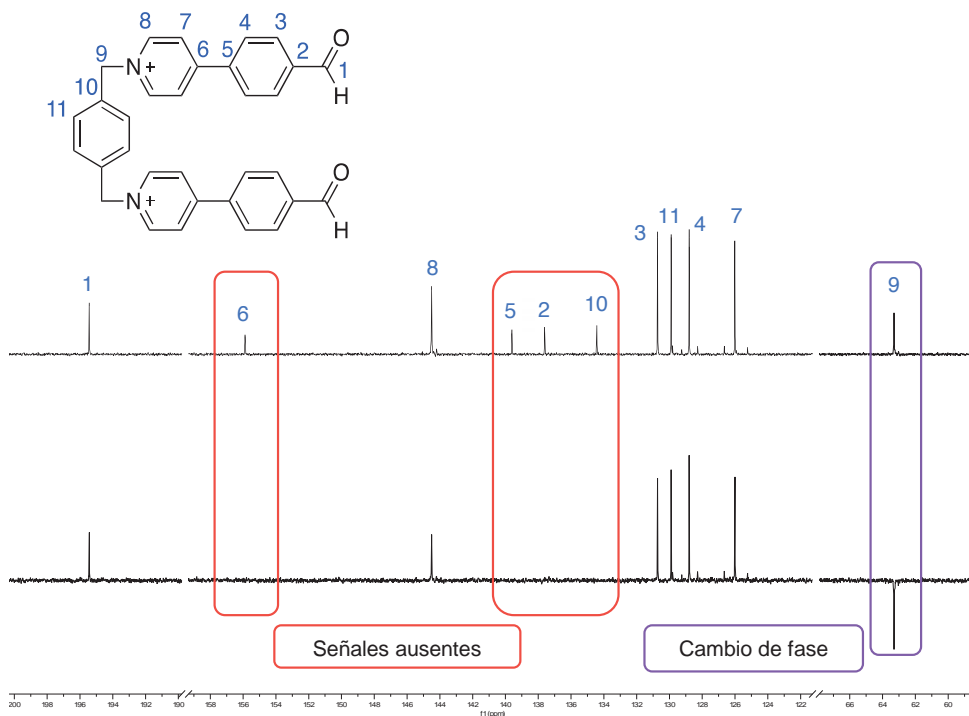


Figura 19. Arriba) Espectro RMN- ^{13}C (D_2O , 126MHz) de DA, los números indican la asignación de las señales. Abajo) Espectro DEPT RMN- ^{13}C de DA.

En el espectro DEPT se observa que solo ha cambiado de fase la señal de 63 ppm lo que indica que se trata de un carbono secundario. De esta forma, tanto el DEPT como el desplazamiento químico nos indican que la señal de 63 ppm se corresponde con el carbono C_9 . Además, las señales que están ausentes son las de los cuatro carbonos cuaternarios que hay en la molécula, que se asignaron con la ayuda del resto de los espectros bidimensionales. De acuerdo con el desplazamiento químico es fácilmente identificable el carbono $\text{C}=\text{O}$ del aldehído, que es la señal más desapantallada de 195 ppm (C_1).

El espectro bidimensional HSQC (Figura 20) correlaciona las señales de los núcleos ^1H y ^{13}C que están enlazados directamente. De esta forma al conocer la asignación de un protón es posible saber la del carbono al que está enlazado y viceversa.

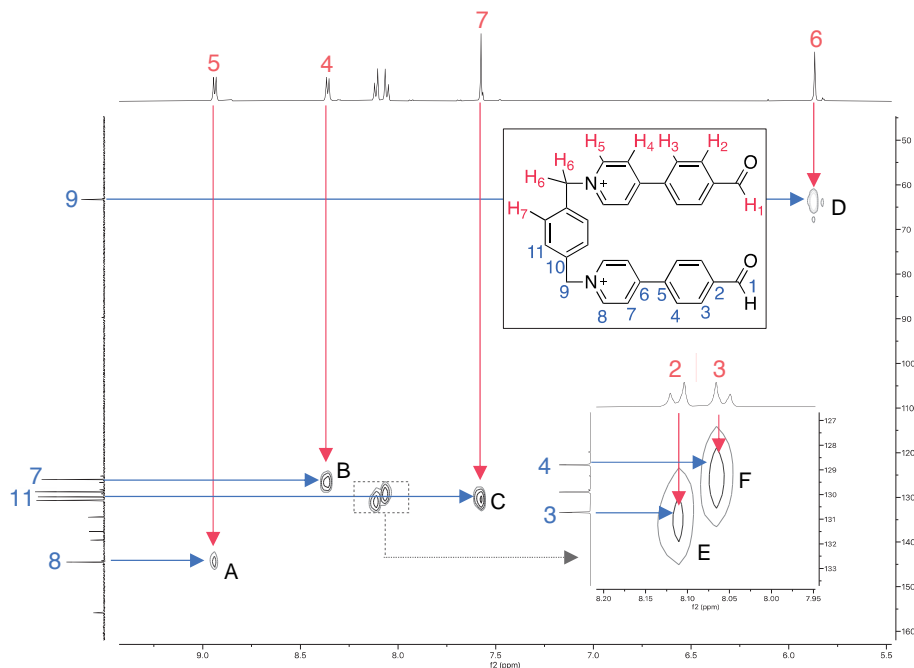


Figura 20. Espectro HSQC (500 MHz, D₂O) de DA. Las flechas indican las correlaciones entre los núcleos ¹H (eje horizontal) y ¹³C (eje vertical).

De esta forma se pudo asignar las señales de los carbonos terciarios usando las correlaciones con los protones conocidos, como se observa en la Figura 20. El cruce A nos indica que el protón H₅ está unido a C₈, en alfa al nitrógeno del piridino, mientras que el cruce B muestra que H₄ se encuentra unido al carbono C₇. Para identificar a los carbonos del xileno se puede comprobar su correlación C con la señal de los hidrógenos H₇, aunque los picos están bastante juntos se puede deducir que se corresponde con la señal 11. Además, el cruce D confirma que las señales de los protones H₆ y carbonos C₉ metílicos fueron asignadas correctamente.

Con espectro bidimensional HMBC se pudo identificar el resto de señales: la de los carbonos cuaternarios y la de los protones y carbonos aromáticos del benzaldehído (Figura 21). En este caso el espectro muestra correlaciones entre ¹H y ¹³C, pero a dos o tres enlaces de distancia.

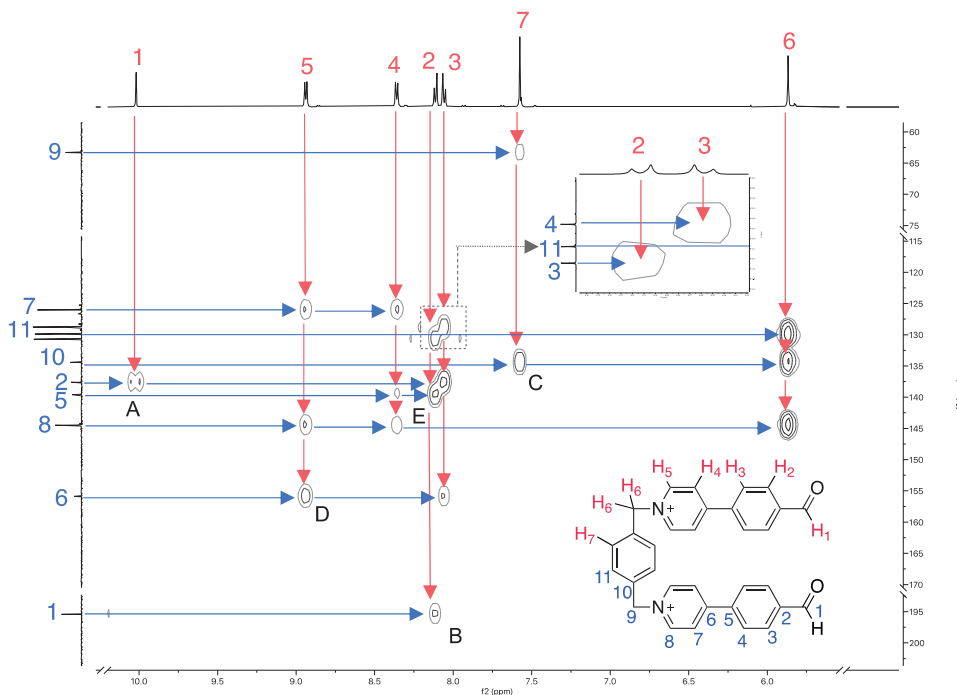


Figura 21. Espectro HMBC de DA. Solo se etiquetan los cruces relevantes para la asignación.

Se pudo identificar la señal de los C₂ cuaternarios, ya que es la única que presenta cruce con la del H₁ del aldehído (A). De la misma forma, la señal de los carbonos C₁ de los aldehídos solo tienen correlación con la señal del H₂ estando a tres enlaces de distancia (B). Al conocer la señal de H₂, por descarte se pudo asignar la de H₃. Solo quedaría por diferenciar los carbonos cuaternarios C₅, C₆ y C₁₀. La señal de C₁₀ es la única de ellas que tiene cruce con los hidrógenos metílicos H₇ (C). Mientras que la señal de C₆ es la única en la que se observa cruce (D) con los protones en posición alfa al nitrógeno del piridino de los que se encuentra a tres enlaces de distancia. Por último, en el caso del C₅ presenta cruce (E) con el H₂ estado también a tres enlaces.

Además, la estructura del compuesto DA también fue caracterizada mediante espectroscopía de masas. Los picos relevantes de relación masa/carga observados fueron: [DA-2Br]²⁺ = 235,099 m/z, calculado a 235,099 m/z como él más intenso; y [DA-Br]⁺ = 549,117 m/z, calculado a 549,117 m/z.

Cabe destacar que, en la elucidación estructural del dialdehído DAR usado para la “Red Box” no se observan los protones del aldehído (Figura16),^[32] si no que se encuentra hidratado formando un acetal. En el caso de DA aparecen señales poco intensas que se corresponden con el aldehído hidratado (marcadas con un asterisco *, Figura 17). De acuerdo a las integraciones se puede determinar que el aldehído

hidratado se encuentra en una relación 15:85 con respecto al aldehído sin hidratar. Es posible explicar esta diferencia ya que al carecer del anillo fenilo extra en **DAR** el aldehído se encuentra enlazado directamente al anillo piridino que, por efecto inductivo, le retira carga de manera más intensa haciéndolo más reactivo. De esta forma, el agua lo ataca mediante una adición nucleófila hidratándolo. En cambio, el anillo fenilo extra del dialdehído utilizado en este trabajo hace que el efecto inductivo sea mucho menos intenso y el ataque del agua menos favorable. Esta observación puede ofrecer pistas sobre la reactividad de **DA**, que será previsiblemente menor que el empleado en la síntesis de la “Red Box”.

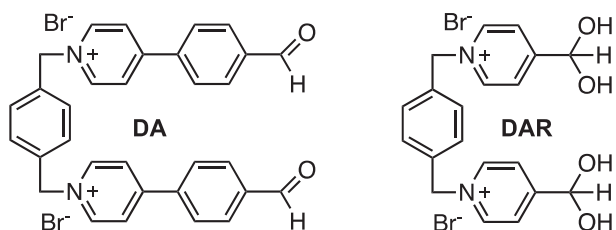
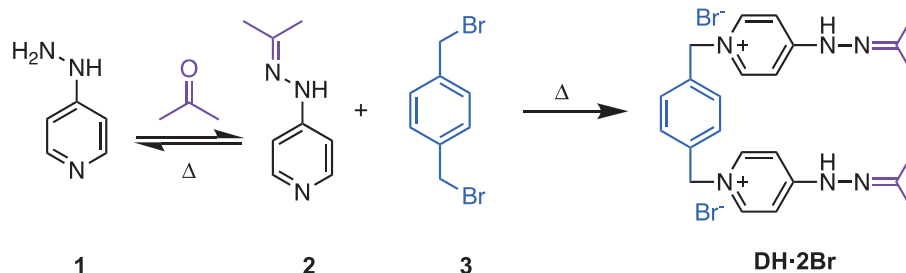


Figura 22. Comparación entre la estructura mayoritaria del dialdehído utilizado en el macrociclo de este trabajo y la observada en la síntesis de la Red Box.

1.3 Síntesis y caracterización de la dihidrazona (**DH-2Br**)

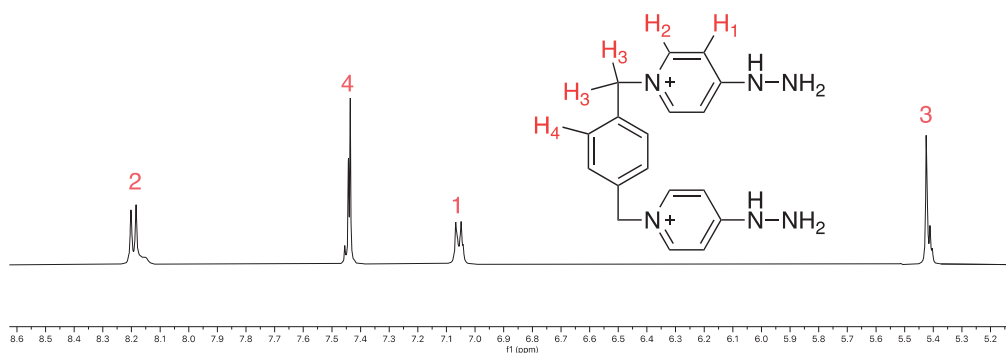


Esquema 2. Síntesis de la dihidrazona **DH**.

Como se muestra en el *Esquema 2*, para la síntesis del segundo building block (**DH**) se partió de la 4-hidrazinopiridina (**1**). El objetivo es que el nitrógeno de la piridina reaccione mediante una S_N2 con el bromo del 1,4-(dibromometil)benceno (**2**). Para evitar posibles reacciones a través de la amina primaria del grupo hidracina, es necesario proteger el grupo hidracina para que la reacción ocurra a través del nitrógeno de la piridina. Para ello, se protegió a través de la formación del grupo hidrazona, haciendo reaccionar previamente **1** con acetona. Una vez protegido **1**, se hizo reaccionar con el compuesto **3** por medio de dos reacciones S_N2 para dar lugar a la dihidrazona **DH** como sal de bromuro. Para facilitar su caracterización, se hidrolizó **DH**

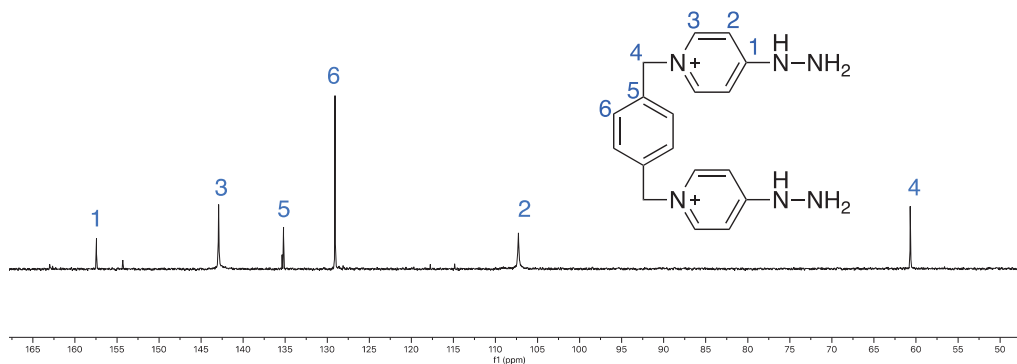
en agua con catálisis ácida y de esa manera obtener **DH** como hidracina. La caracterización de **DH** se llevó a cabo mediante espectroscopía RMN- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ mono y bidimensional.

En el espectro RMN- ^1H (*Figura 23*) se observan cuatro señales, la de menor desplazamiento químico se corresponden con los protones metílicos. En el caso de las señales aromáticas se utilizó el mismo razonamiento que en el compuesto **DA**, con la ayuda de los espectros bidimensionales.



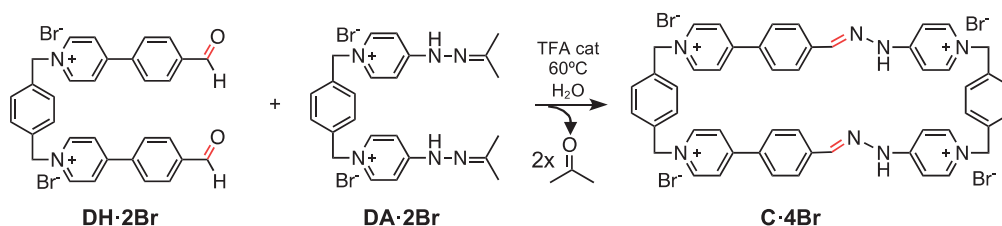
*Figura 23. Espectro RMN- ^1H (400MHz, D_2O) de **DH**.*

En el caso del espectro RMN- ^{13}C (*Figura 24*) se observan el número de señales esperadas. Es fácilmente identificable la señal de los carbonos metílicos, al ser la más apantallada. El resto de las señales se asignaron usando el espectro DEPT, HSQC y HMBC, de la misma forma que para el anterior compuesto.



*Figura 24. Espectro RMN- ^{13}C (101MHz, D_2O) de **DH**.*

2. Ensamblaje, caracterización y purificación del macrociclo C-4Br.



Esquema 3. Reacción de ensamblaje del macrociclo **C**

Para el ensamblaje del macrociclo **C** reaccionan ambos “building blocks” complementarios (**DH** y **DA**) para formar un enlace imina mediante DCvC. La reacción se llevó a cabo empleando las mismas condiciones sintéticas que para la “Red Box”,^[32] en agua con catálisis ácida y calentamiento a 60°C durante 24 h. Primero tiene lugar la hidrólisis del grupo hidrazona de **DA**, seguido de la reacción con **DH** formando **C** a través de dos nuevos enlaces hidrazona. La reacción tiene lugar en concentraciones significativamente bajas (2 mM), de esta forma se favorece el cierre intramolecular del macrociclo frente a otros posibles oligómeros.

Como ya ocurría con la Red Box, la inusual estabilidad del enlace imina en medio acuoso es una de las características más destacables del ciclofano sintetizado. Como se mencionó en la introducción, el enlace imina se trata de un enlace covalente reversible que con exceso de agua es posible hidrolizarlo. Sin embargo, aunque la reacción es llevada a cabo en medio acuoso el enlace imina permanece estable. Este fenómeno es explicado por el efecto de resonancia producido por la amplia deslocalización del par electrónico del nitrógeno del grupo amina a lo largo de los anillos aromáticos de la varilla del macrociclo (*Figura 25*). Esto provoca que el carbono C=N sea mucho menos electrófilo de lo normal, causando que el enlace quede cinéticamente “atrapado” al no poder ser hidrolizado aun encontrándose en una solución acuosa.

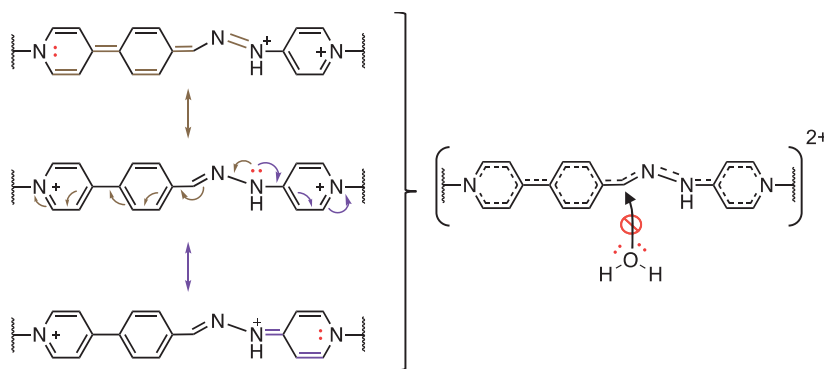
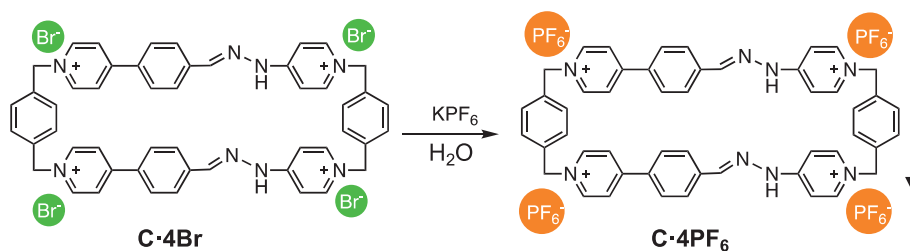


Figura 25. Formas resonantes de la varilla del macrociclo y su estabilidad cinética frente la hidrólisis.

Para obtener una muestra del macrociclo con elevada pureza para realizar su caracterización y experimentos, este se purificó mediante HPLC semipreparativo en fase reversa utilizando un detector UV-Vis. El problema de este método de purificación, es que solo se puede purificar una muy pequeña cantidad del producto. Por lo tanto, el resto del producto se purificó precipitándolo del medio mediante una reacción de metátesis en la que se cambia el contraión. En medio acuoso cuando los contraiones se solvatan bien en agua, como es el caso del bromuro, el compuesto será soluble. Sin embargo, añadiendo un exceso de KPF_6 , el contraión cambia por uno que no se solvata bien y precipita. El precipitado en cambio, será soluble solo en disolventes orgánicos como el CH_3CN .



Esquema 4. Reacción de metátesis cambio de contraión de $\text{C}\cdot\text{4Br}$ a $\text{C}\cdot\text{4PF}_6$ en agua empleando un exceso de KPF_6 .

La caracterización del macrociclo puro se realizó según el método usado en los anteriores compuestos, empleando técnicas de RMN- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ mono y bidimensionales, además de espectroscopía de masas. Sin embargo, en esta ocasión la asignación resulta más compleja, ya que la deslocalización de la carga hace que algunos enlaces adquieran un carácter parcial de doble enlace de forma que se impide la libre rotación de los anillos. Este fenómeno ocurre especialmente en el enlace entre el grupo amino y el anillo piridínico perteneciente a la **DH** (Figura 26). Si el equilibrio de interconversión de los protones es rápido en la escala de tiempos de RMN, se observará únicamente una señal en el espectro ($H_x = H_x$). Por contra, si la interconversión se encuentra impedida y tiene lugar de forma lenta, los protones no serán magnéticamente equivalentes y se observarán dos señales distintas ($H_x \neq H_x$). Sin embargo, en ocasiones el equilibrio no es lo suficientemente lento como para que se vean claramente dos señales diferenciadas, ni tampoco lo suficientemente rápido como para que solo se vea una señal. Lo que se observa es la señal en coalescencia, que se trata de una especie de singlete ancho promedio de ambas señales que dificulta la elucidación del espectro. De hecho, en ocasiones se llega a una situación de coalescencia perfecta donde la señal es prácticamente imperceptible (Figura 26).

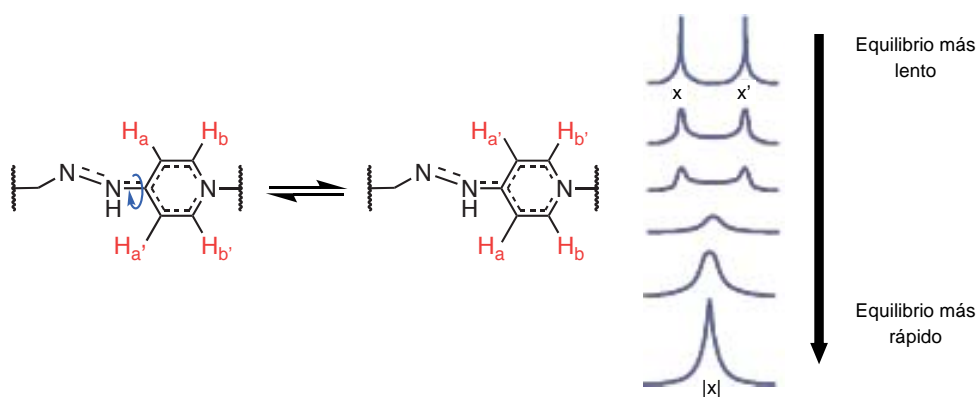


Figura 26. Equilibrio de interconversión de protones y su influencia en las señales observadas en RMN.

En el caso del espectro RMN- ^1H del macrociclo en agua deuterada y a temperatura ambiente (Figura 27), se observan numerosas señales poco definidas y difíciles de asignar debido al impedimento de la libre rotación de los anillos perteneciente al **DA** y en mayor medida por los pertenecientes al del **DH**. Aun así, es posible identificar algunas señales de forma clara, por ejemplo, la señal más desapantallada se corresponde a los protones H_9 alfa al nitrógeno del piridinio del bloque del **DA**. Se trata de un doblete muy bien definido al ser de protones equivalentes sin impedimento de rotación. En base a esa asignación, usando los espectros bidimensionales HSQC y HMBC es posible asignar los protones de los metilenos (H_2 y H_{10}) y de los anillos aromáticos del lado corto (H_1 y H_{11}). El protón del grupo amino no se observa ya que se encuentra deuterado debido a su acidez.

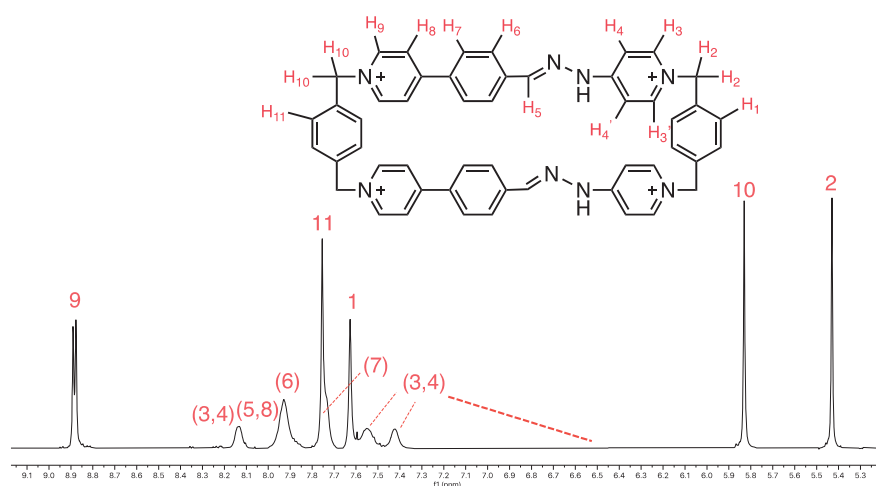
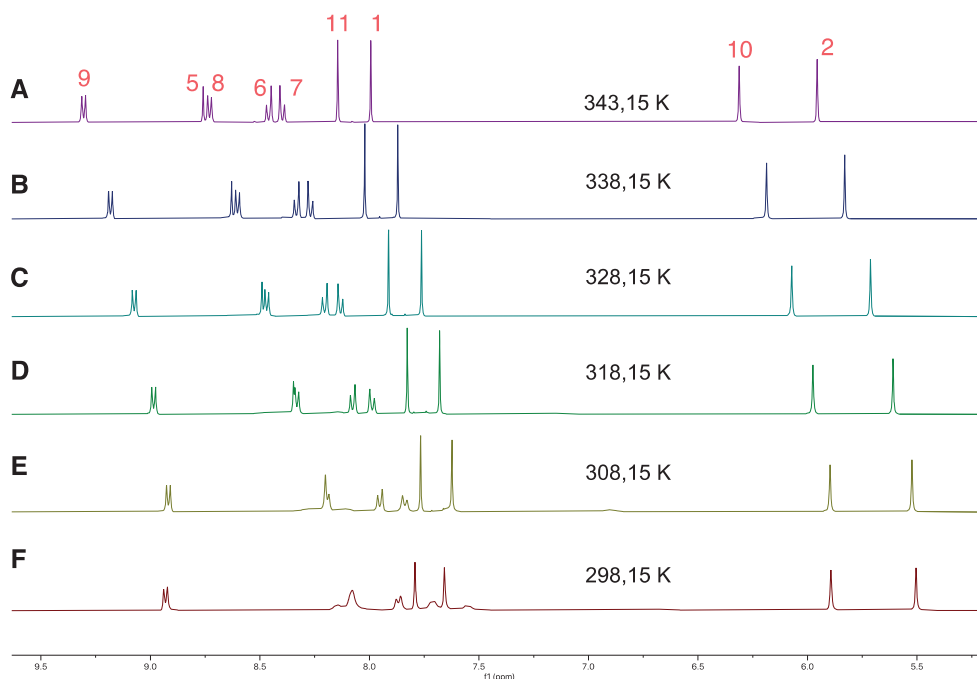


Figura 27. Espectro RMN- ^1H (D_2O , 500 MHz) del macrociclo **C**. Las asignaciones entre paréntesis corresponden a señales en coalescencia poco definidas.

Para tratar de resolver las señales se mide el espectro RMN- ^1H del macrociclo **C** con incrementos de temperatura (*Figura 28*). Al elevar la temperatura la rotación de los enlaces ocurre de una manera más rápida. De esta forma, se puede resolver el espectro hacia el equilibrio rápido.



*Figura 28. Espectros RMN- ^1H (D_2O , 500 MHz) macrociclo **C** medidos a diferentes temperaturas en incrementos de 10 K desde 298,15 K a 343 K.*

Como se observa en la *Figura 28A*, a 347.15 K las señales se encuentran más definidas y resueltas. Las señales de los protones H_6 y H_7 del grupo fenilo del bloque del **DA** se tornan en dos dobletes acoplados y bien definidos. Además, es posible diferenciar la señal de los protones H_5 del grupo imina como singlete y el doblete de los protones restantes del anillo piridínico (H_8). Por la contra, las señales de los protones H_3 , H_3' , H_4 y H_4' del anillo piridínico del bloque de la **DH**, que a temperatura ambiente se podría intuir que estaban en una situación de equilibrio lento, a 347.15 K sus señales entran en coalescencia perfecta y no se observan. En lo que respecta a la caracterización mediante RMN- ^{13}C , el efecto de la coalescencia hace que no se puedan observar todas las señales esperadas. Aun así, es posible identificar fácilmente los carbonos metilénicos a 61 y 63 ppm, y algunas señales características de carbonos aromáticos (*anexos A5*).

Es interesante caracterizar al receptor también en un disolvente orgánico. El espectro RMN del macrociclo asimismo fue medido usando acetonitrilo deuterado (*Figura 29*).

Sorprendentemente, en este caso a temperatura ambiente las señales se observan bien definidas. El equilibrio de rotación del anillo piridínico del bloque de la **DH** se encuentra en equilibrio lento, observándose claramente cuatro señales diferenciadas para cada uno de los protones (H_3 , H_3' , H_4 y H_4'). A mayores, al usarse un disolvente deuterado aprótico es posible observar la señal del protón ácido de la amina (H_{12}), que se encuentra a 13,5 ppm, que es significativamente mayor al desplazamiento típico de las aminas. Este inusual desplazamiento puede ser explicado por la marcada deslocalización de su par electrónico que provoca que el núcleo se encuentre mucho más desapantallado de lo habitual.

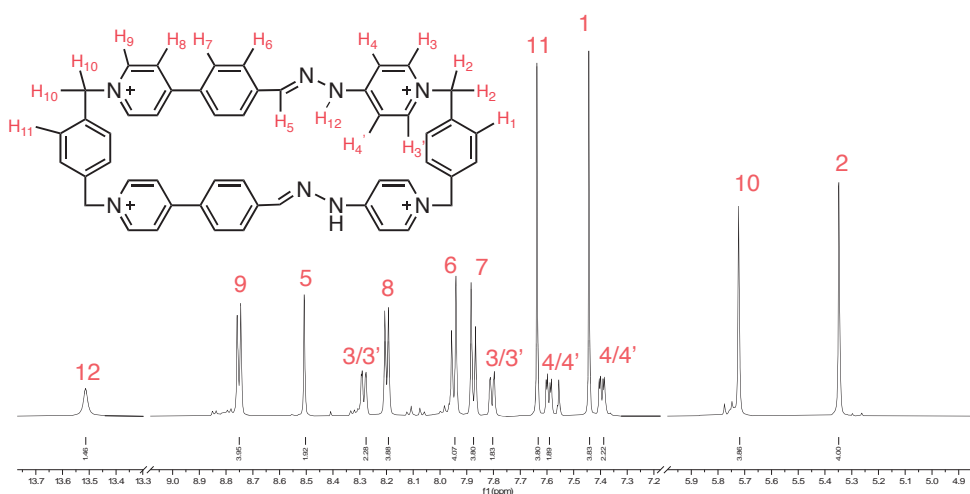


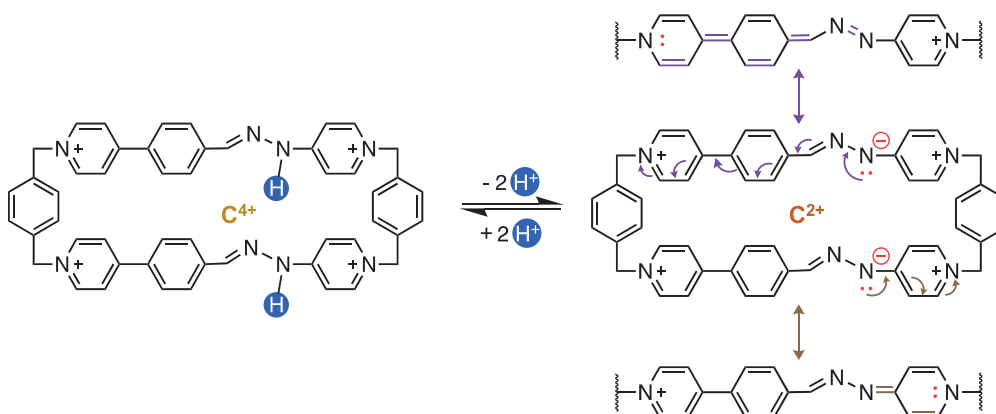
Figura 29. Espectro RMN- 1H (CD_3CN , 500 MHz) del macrociclo **C**.

El espectro de RMN- ^{13}C medido en acetonitrilo deuterado como disolvente contiene las diecisiete señales esperadas, una para cada uno de los carbonos no equivalentes (*anexas A10*). Siguiendo el modelo de la elucidación de los anteriores compuestos con los espectros bidimensionales COSY, HSQC y HMBC, es posible asignar sus señales y confirmar la estructura del macrociclo (*anexas A12, A13, A14*)

Por último, **C-4TFA** también fue caracterizada por espectroscopía de masas. Los picos relevantes de relación masa/carga observados fueron: $[C-2H-4TFA]^{2+} = 377,176$, calculado a 377,176 m/z, del macrociclo desprotonado como el más intenso y $[C-2H-3TFA]^+ = 867,338$ m/z, calculado a 867,337 m/z del macrociclo desprotonado con una molécula de TFA como contraión.

3. Respuesta del macrociclo a estímulos ácido-base

3.1 Comportamiento ácido-base



Esquema 5. Equilibrio ácido-base del macrociclo **C** y formas resonantes de su base conjugada.

La inusual acidez del hidrógeno del grupo amina en esta familia de macrociclos es una de las características más destacables e interesantes que presentan. Como se ha visto con su homólogo “Red Box”, la desprotonación del grupo amina genera una carga formal negativa la cual se encuentra muy estabilizada por la elevada conjugación a lo largo de sus anillos aromáticos. Este efecto se traduce en diferencias espectroscópicas entre cada especie. El compuesto protonado presenta una banda asociada a transiciones tipo $\pi - \pi^*$ en torno a 365 nm mientras que la forma desprotonada no contiene esta banda a 365 nm y presenta una nueva a 464 nm asociada a un proceso de transferencia de carga.^[32]

En el caso de **C**, en el espectro RMN $-H^1$ de **C**²⁺ medido en una disolución tamponada a medio básico (pD = 12) se observan las señales mucho más distorsionadas a causa de la coalescencia (*anexos A15*). Esto es debido a que la mayor deslocalización de la carga genera mayor componente de doble enlace (*Esquema 5*). Por lo tanto, la base conjugada **C**²⁺ del ciclofano tiene una fuerte estabilización por resonancia ocasionando que los protones de la amina sean especialmente ácidos. Ambos protones son independientes y equivalentes de forma que se observa que reaccionan prácticamente al mismo tiempo.

3.2 Estudio espectroscópico de las formas ácida y básica del macrociclo en disolución acuosa

El primer estudio llevado a cabo es el comportamiento de **C** a diferentes concentraciones (cumplimiento de la ley de Lambert-Beer) en medio ácido y básico, además de obtener el valor de los coeficientes de absorptividad de la especie **C**⁴⁺ y **C**²⁺.

De forma cualitativa, se observó que el color de **C** en medio neutro/ácido (pH=2 y pH =7) es amarillento, mientras que en medio básico (pH = 12) es naranja-rojizo. Para determinar exactamente la posición de las bandas de absorción y conocer el coeficiente de absorptividad molar (ϵ) de ambas formas \mathbf{C}^{4+} y \mathbf{C}^{2+} en primer lugar, se mide el espectro de absorción UV-Vis del macrociclo a varias concentraciones en medio ácido y básico.

El coeficiente de absorptividad molar (ϵ) relaciona la absorbancia a una longitud de onda determinada y la concentración de un compuesto mediante la ley de Lambert-Beer $A = \epsilon * d * C$, donde A es la absorbancia; d, la distancia recorrida por la radiación incidente (longitud de la cubeta, normalmente y en este caso 1 cm) y C, la concentración. Para determinarlo experimentalmente, se realiza un ajuste lineal entre la absorbancia y la concentración, donde el coeficiente ϵ es la pendiente de la recta.

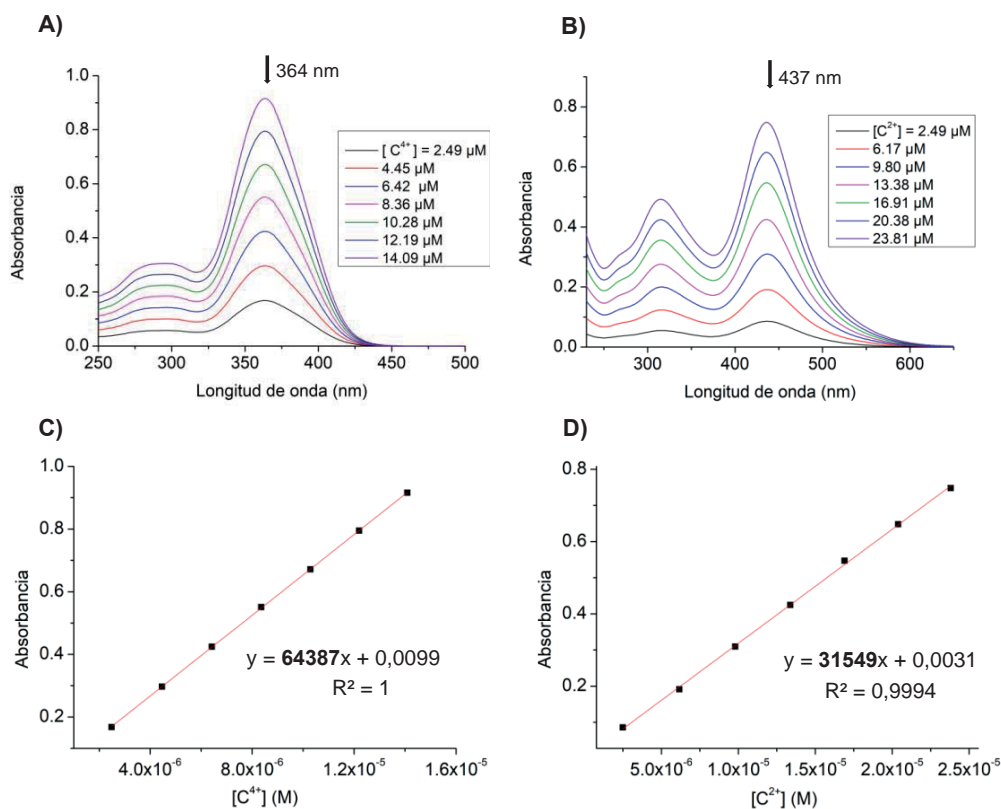


Figura 30. A) Espectro UV-Vis de la forma protonada del macrociclo \mathbf{C}^{4+} tamponada en medio ácido (pH = 2), a concentración desde 2,49 μM a 14,09 μM . B) Espectro UV-Vis de la forma desprotonada del macrociclo \mathbf{C}^{2+} tamponada en medio básico (pH = 12) a concentración desde 2,49 μM a 23,81 μM . C) Relación lineal entre la absorbancia medida a 364 nm y la concentración de una disolución tamponada en medio ácido del macrociclo \mathbf{C}^{4+} . D) Relación lineal entre la absorbancia medida a 437 nm y la concentración de una disolución tamponada en medio básico del macrociclo \mathbf{C}^{2+} .

Como se puede ver en la Figura 30A, el compuesto a pH = 2 presenta una banda de absorción centrada a 364 nm asociada a las transiciones tipo $\pi-\pi^*$, mientras que a pH =

12 (Figura 30B) el compuesto presenta una banda centrada a 437 nm asociada a un proceso de transferencia de carga, como se había observado con su análogo “Red Box”.^[32] Estos resultados justifican el cambio de color a rojo intenso observados a simple vista. Realizando el ajuste lineal se puede determinar $\epsilon_{364\text{nm}} = 64387 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para el macrociclo protonado C^{4+} . Y $\epsilon_{437\text{nm}} = 31549 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para la forma desprotonada del macrociclo C^{2+} (Figura 30C-D). Teniendo en cuenta estos datos es más sencillo preparar disoluciones de una concentración adecuada para realizar una valoración UV-Vis para determinar el pK_a .

3.3 Determinación espectrofotométrica del pK_a del macrociclo

La constante pK_a se define como el logaritmo decimal negativo de la constante de equilibrio de la disociación de un ácido: $\text{pK}_a = -\log K_a$. Además es el pH al que un ácido y su base conjugada están presentes en concentraciones iguales.^[38] Por lo que su determinación resulta muy interesante de cara a controlar las propiedades ácido-base del macrociclo, ya que indicará a partir de que pH se encuentra mayoritariamente desprotonado.

Para su determinación se realiza una valoración espectrofotométrica UV-Vis donde se varía el pH a una disolución con concentración constante de macrociclo y se mide el espectro de absorción. La ordenada en el origen del ajuste lineal del pH y el $\log[(\text{Abs}_{437} - \text{Abs}_{\text{C}^{4+}})/(\text{Abs}_{\text{C}^{2+}} - \text{Abs}_{437})]$ es el valor del pK_a obtenido, en este caso $\text{pK}_a = 9,67$. (Figura 31B)

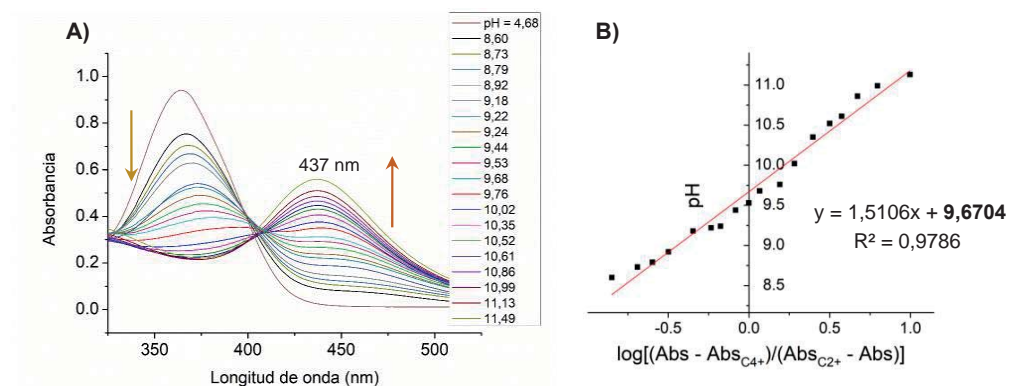


Figura 31. A) Espectro UV-Vis de la valoración del macrociclo a una concentración de $14 \mu\text{M}$ en disoluciones tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ y $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$. B) Ajuste lineal entre el pH y el $\log[(\text{Abs}_{437} - \text{Abs}_{\text{C}^{4+}})/(\text{Abs}_{\text{C}^{2+}} - \text{Abs}_{437})]$.

En el espectro de la valoración (Figura 31A) no se observa un punto isobéptico definido, ya que a pesar de ser dos protones prácticamente equivalentes y que se disocian simultáneamente puede haber pequeñas diferencias entre ellos. De forma que,

puede haber una fracción de moléculas que solo han disociado uno de sus protones ácidos alterando la medida exacta de ese punto o incluso debido a la poca solubilidad del compuesto algún equilibrio de precipitación. Por lo tanto, el pK_a estimado de ambos protones será aproximadamente 9,7 aunque para obtener un valor más exacto habría que realizar otro tipo de experimentos como una valoración potenciométrica.

Es sorprendente obtener un valor de pK_a tan bajo para un hidrógeno de una amina. Comparándolo con la anilina ($pK_a \sim 28$)^[38], cuya base conjugada también tiene una marcada estabilización por resonancia, el valor del macrociclo **C** es casi 20 unidades menor. Esta drástica reducción se explica por la mayor estabilización por resonancia de la base conjugada debida a la deslocalización de la carga a lo largo de los anillos aromáticos de la estructura (*Esquema 5*).

La deslocalización de la carga, como se ha comentado previamente, es lo que proporciona al enlace imina del macrociclo, una inusual estabilidad frente a la hidrólisis. De esta forma el valor del pK_a , que está determinado por la estabilización por resonancia de la base conjugada, puede servir como un indicador de la fortaleza del enlace y estabilidad del macrociclo. En el caso de la "Red Box" el pK_a estimado también por una valoración espectrofotométrica es de 8,3.^[32] Lo que indica que presenta una mayor deslocalización de la carga y por lo tanto su enlace imina es más fuerte haciendo más difícil su hidrólisis. Es posible, que al tener un anillo aromático extra el efecto inductivo del nitrógeno del grupo piridinio cargado sea menos intenso, haciendo que la estabilización sea un poco más débil.

La presencia de protones con una constante de acidez $pK_a \sim 9,7$ permite controlar el equilibrio ácido-base en medio acuoso y sin recurrir a condiciones fuertes. De esta forma, el macrociclo se podría utilizar como un interruptor molecular que responde a estímulos ácido-base. A un pH mayor a 9,7 se encontrará mayoritariamente en su forma desprotonada y a un pH menor, en su forma protonada. Este cambio a nivel molecular también podría tener implicaciones en su comportamiento supramolecular. Cuando el macrociclo está desprotonado la mayor deslocalización de carga hace que los anillos sean menos electro-deficientes y por tanto disminuiría su capacidad de complejación. De esta forma se podría controlar la formación de los agregados receptor-sustrato en base a un estímulo externo fácilmente controlable como el pH.

4. Formación de complejos de inclusión receptor-sustrato

Al igual que la Red Box, el macrociclo **C** presenta características estructurales idóneas para ser un buen receptor de sustratos aromáticos con sistemas π electroexcedentes. Tiene una estructura compacta y bien preorganizada, con una cavidad hidrofóbica de dimensiones ideales para este tipo de sustratos, además, contiene paredes aromáticas deficientes en carga capaces de establecer interacciones tipo π - π con moléculas aromáticas excedentes en carga. Además, el anillo fenílico extra permitirá la inclusión de sustratos de mayor tamaño o un mayor número de equivalentes que en el caso de la "Blue Box" o su análogo "Red Box" (Figura 32).

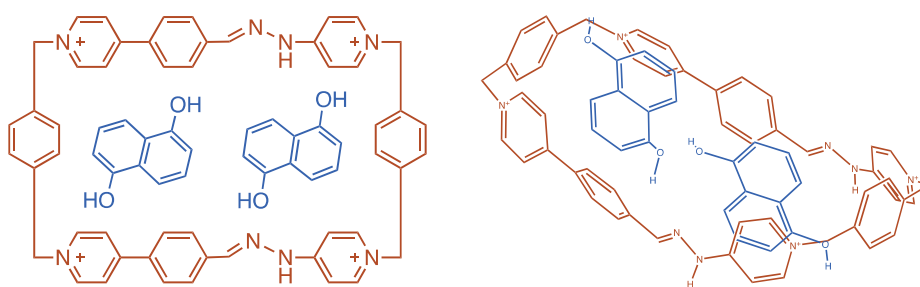


Figura 32. Modelo 2D y 3D de un complejo de inclusión con estequiometría 1:2 del macrociclo **C**⁴⁺ con el 1,5-DHN

Para determinar experimentalmente la formación de un complejo de inclusión es de gran utilidad la espectroscopía RMN. La inclusión del sustrato en la cavidad del receptor provoca un marcado apantallamiento de las señales del sustrato debido a la inclusión de este en la cavidad hidrofóbica.^[36] Las señales del receptor también sufren un cambio en su desplazamiento químico, aunque en este caso pueden variar tanto hacia un campo más bajo o más alto, ofreciendo información del tipo de interacción generada.

4.1 Complejo de inclusión **C**⁴⁺⊂1,5-DHN

Se estudió la formación de un complejo de inclusión entre el macrociclo **C** y el 1,5-dihidroxinaftaleno (1,5-DHN), ya que tiene las características estereoelectrónicas ideales para actuar de sustrato al ser una molécula aromática con un sistema π excedente en carga. Para ello se mezclaron 300 μ L de una disolución 1mM tamponada a pD = 2 del macrociclo **C** en D₂O, con 100 μ L de una disolución 5 mM de 1,5-DHN y se registró su espectro RMN-¹H.

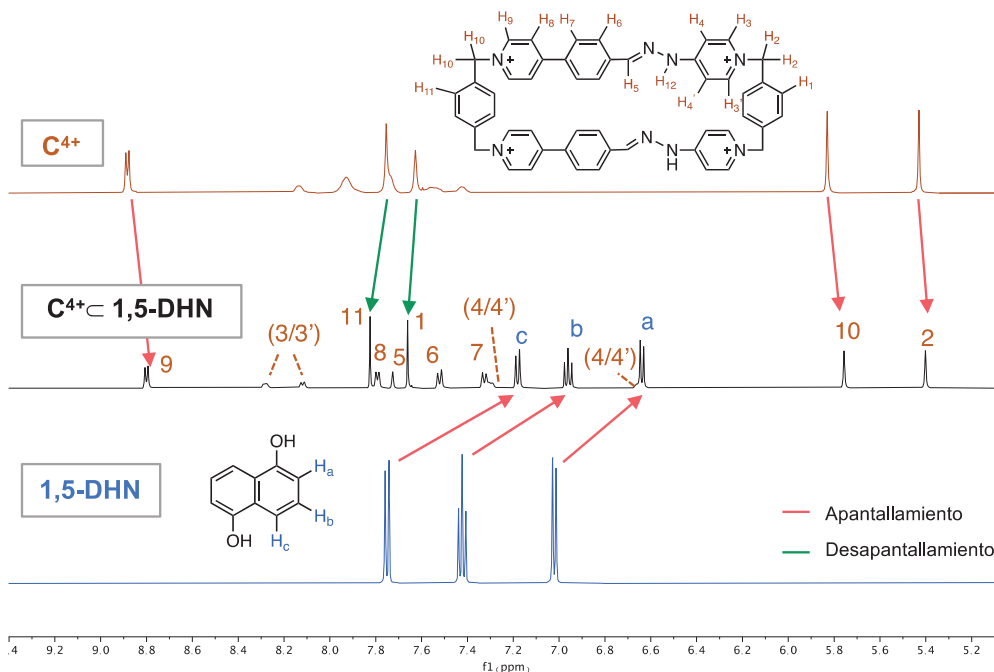


Figura 33. Espectro RMN- ^1H (500 Hz, D_2O) de: arriba, C^{4+} , macrociclo en su forma ácida; centro, $\text{C}^{4+} \subset 1,5\text{-DHN}$ complejo de inclusión al mezclar C^{4+} y un exceso de $1,5\text{-DHN}$; abajo, una disolución de $1,5\text{-DHN}$ puro.

Cómo se observa en la Figura 33 las tres señales del 1,5-DHN se apantallan considerablemente al mezclarse con el macrociclo **C**. Este desplazamiento es una señal clara de que el compuesto se ha introducido en la cavidad del receptor formando un complejo de inclusión. También se observa que las señales de los protones aromáticos de los anillos laterales del macrociclo (H_{11} y H_1) sufren un ligero desplazamiento a un campo más bajo. Se puede explicar por el efecto de las interacciones $\text{CH}\cdots\pi$ entre los hidrógenos del 1,5-DHN y el anillo aromático de del lado corto de **C**. La señal H_9 de los protones α al nitrógeno de la piridina del lado del dialdehído se apantalla ligeramente, en este caso mediante las interacciones $\pi\text{-}\pi$ el sustrato transfiere carga al sistema electro-deficiente π del anillo piridínico de forma que se retira menos carga sus protones y sus señales resultan un poco más apantalladas.

Al formarse el complejo de inclusión la presencia del 1,5-DHN dentro de la cavidad del receptor provoca que la rotación de los enlaces se encuentre impedida. De esta forma se ralentiza el equilibrio de interconversión de los protones y en el espectro pasan a aparecer las señales del macrociclo bien resueltas (Figura 26). Incluso se pueden observar las cuatro señales del anillo piridínico (H_3 , $\text{H}_{3'}$, H_4 , $\text{H}_{4'}$) de la **DH** resueltas en equilibrio lento. Estas señales no se observaban a alta temperatura en el RMN a temperatura variable porque se encontraban en coalescencia perfecta (Figura 28).

Teniendo en cuenta el experimento, es posible afirmar de forma cualitativa que se ha formado un complejo de inclusión receptor-sustrato entre el macrociclo y el 1,5-DHN. Estéricamente es posible que el complejo siga una estequiometría 1:1 o 1:2 (*Figura 32*) de la misma forma que ocurre en otros macrociclos similares previamente reportados.^[20] Sin embargo, para determinar de forma cuantitativa la estequiometría y la constante de asociación sería necesario realizar una valoración midiendo los desplazamientos en RMN en función de los equivalentes de sustrato añadidos.

5. Experimento de la estabilidad cinética del macrociclo

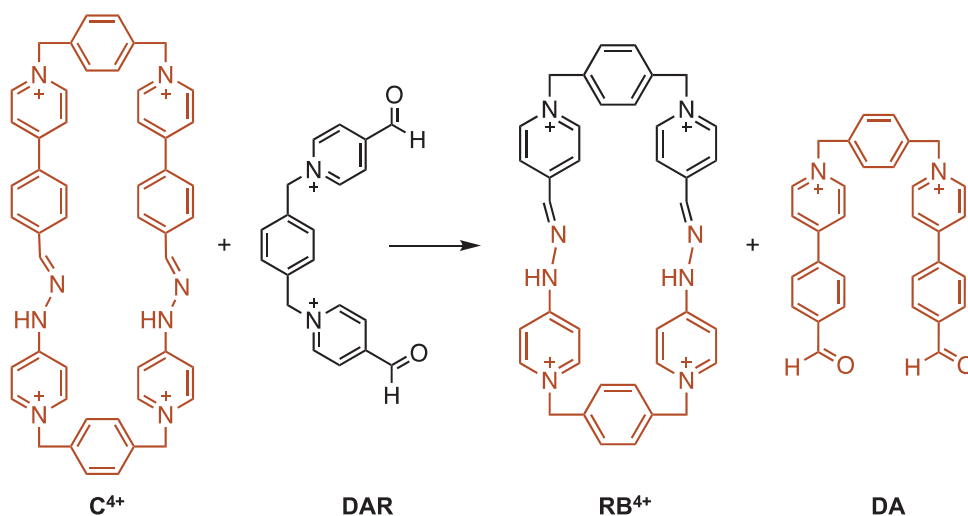


Figura 34. Hipótesis de transformación irreversible del macrociclo C^{4+} en la Red Box.

Los enlaces imina de la Red Box RB^{4+} son cinéticamente estables, es decir, no están en un equilibrio dinámico con otras especies. La energía de transición para conseguir romper el enlace es demasiado elevada como para que se produzca su rotura, aun existiendo otras posibles especies más estables termodinámicamente.^[32]

Se observa que el macrociclo estudiado C^{4+} es bastante estable cinéticamente al no hidrolizarse en medio acuso. Sin embargo, es posible que sus enlaces imina estén participando en algún tipo de equilibrio bajo control termodinámico. En ese caso, el macrociclo reaccionará de manera irreversible en presencia del building block del dialdehído DAR para formar el ciclofano Red Box. (*Figura 34*). Para comprobar si ocurre esta transformación se mezcló una cantidad equimolar de DAR y C^{4+} en condiciones de ensamblaje (60°C y catálisis ácida) y se registró el espectro RMN- 1H de la mezcla cada día durante siete días.

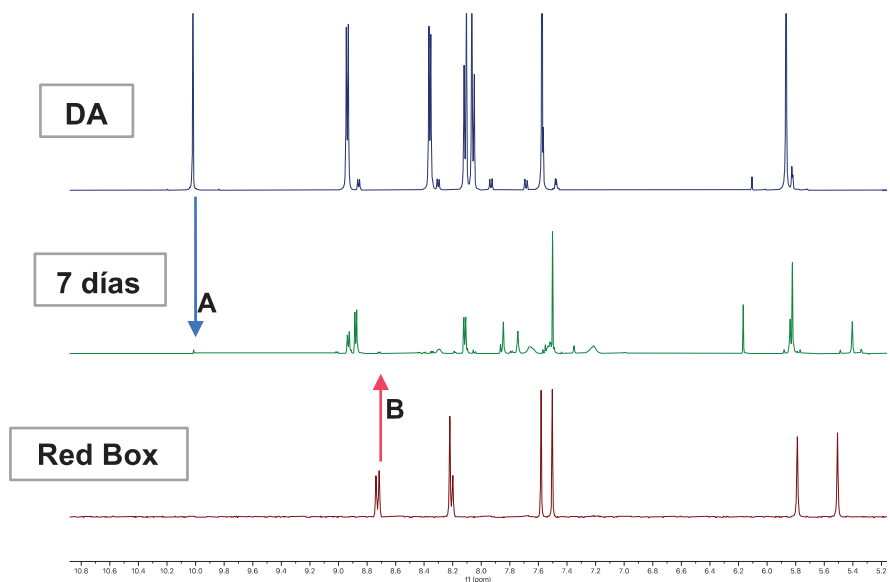


Figura 35. Espectro RMN- ^1H (D_2O , 500 MHz) de: Azul) "building block" dialdehído **DA** puro; Verde) mezcla de cantidades equimolares de macrociclo **C** y de **DAR** tras 7 días de reacción; Rojo) macrociclo **Red Box** puro

Con el transcurso de los días se observaron cambios en el espectro RMN- ^1H , lo que indica que ocurrieron transformaciones en la mezcla. Por una parte, es posible que se haya formando un complejo de inclusión entre el macrociclo y el compuesto **DAR**. Aunque electrónicamente no sean del todo complementarios, al estar en solución acuosa el marcado efecto hidrófobo puede hacer que el **DAR** se encuentre más estabilizado en la cavidad del receptor.

En el espectro RMN- ^1H medido tras siete días de reacción se observa la aparición de una tenue señal de aldehído (A) que podría indicar la hidrólisis del macrociclo **C**. También se intuye que se forman algunas señales características de "Red Box" (B). Al comparar el $\text{p}K_a$ de ambos ciclofanos, el de la Red Box es menor (8,3 frente a 9,7) lo que indica una mayor fortaleza de su enlace imínico por efecto de una mayor deslocalización de carga, por lo que era esperable que el enlace de **C** $^{4+}$ fuera más lábil. Aunque, no es posible confirmarlo con rotundidad este experimento da indicios sobre que el enlace imínico del macrociclo **C** $^{4+}$ puede estar en un muy lento equilibrio dinámico y en presencia de otras especies como el **DAR** puede dar transformaciones en otros compuestos más estables.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Procedimientos generales

Todos los disolventes y reactivos son comerciales y no fueron sometidos a ninguna purificación adicional. El agua utilizada a lo largo del trabajo es de calidad Mili-Q, obtenida un equipo Millipore Gradient A10.

En caso de necesitar seguir la reacción mediante cromatografía de capa fina se emplearon cromatofolios de gel de sílice Merk 60 F254 y radiación ultravioleta (254 e 360 nm) como revelador. Como eluyente se usó "Magic Mixture", una disolución con elevada polaridad preparada a partir de CH₃CN (600 ml), CH₃OH (150 ml), H₂O (150 ml) e NaCl (5 g).

Cuando fue necesario el uso de agitación asistida por ultrasonidos se utilizó el equipo Branson 2510.

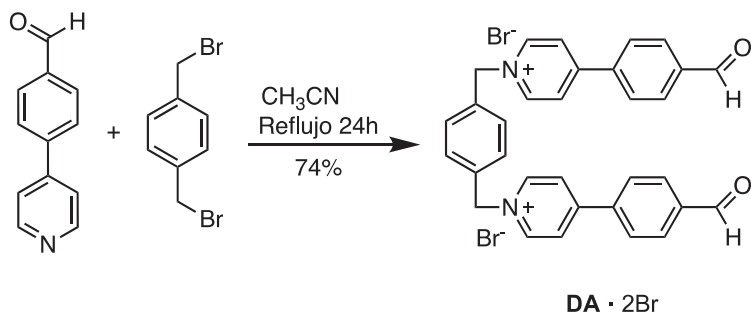
Los espectros UV/Vis fueron registrados en un espectrofotómetro Jasco V-650.

Para el seguimiento de reacciones y confirmar la presencia de compuestos mediante ¹H-RMN se utilizó el espectrómetro Bruker Avance 300 (300 MHz) situado en el CICA (Centro de investigaciones científicas avanzadas). En cambio, para la caracterización de los compuestos y los complejos de inclusión se ha utilizado un espectrofotómetro de mayor resolución, el Bruker Avance 500 con una frecuencia de 500 MHz para los experimentos de ¹H y 125 MHz para los de ¹³C situado en el SAI (Servicios de Apoyo á Investigación). Las muestras fueron preparadas en D₂O o en CD₃CN utilizando como "lock" el disolvente deuterado y como referencia la señal residual del disolvente deuterado.

Los experimentos de espectrometría de masas se realizaron en el SAI, en un espectrómetro LC-Q-q-TOF Applied Biosystems QSTAR Elite para ESI de alta y baja resolución.

2. Síntesis de los componentes

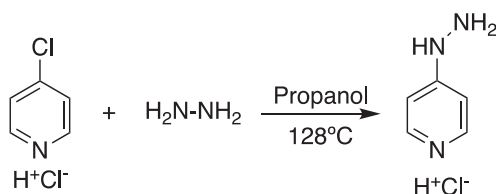
2.1 Síntesis del dialdehído **DA**



En primer lugar, se disuelve 4-(piridin-4-il)benzaldehído (255 mg, 1,39 mmol) en 30 mL de acetonitrilo. A esta disolución se le añade 1,4-(dibromometil)benceno (195 mg, 0,73 mmol) y se calienta a reflujo con agitación durante 24 h. El precipitado formado se filtra a vacío y se lava con acetonitrilo caliente obteniéndose **DA · 2Br** puro como un sólido amarillo (374 mg, 74 %).

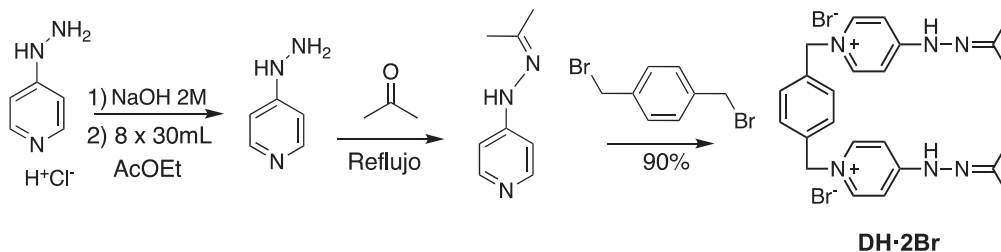
RMN-¹H (500 MHz, D₂O) δ 10.02 (s, 2H), 8.94 (d, $J = 6.9$ Hz, 4H), 8.43 – 8.30 (m, 4H), 8.11 (d, $J = 8.4$ Hz, 4H), 8.06 (d, $J = 8.4$ Hz, 4H), 7.58 (s, 4H), 5.87 (s, 4H). **RMN-¹³C** (126 MHz, D₂O) δ 195.43 (CH), 155.89 (C), 144.50 (CH), 139.61 (C), 137.61 (C), 134.43 (C), 130.72 (CH), 129.90 (CH), 128.80 (CH), 126.01 (CH), 63.31 (CH₂).

2.2 Síntesis de la 4-hidracinopiridina hidrocloreuro



A una suspensión de 4-cloropiridina hidrocloreuro (5,76 g, 38,45 mmol) en 120 mL de propanol se le añade hidracina 50 % en agua (36 mL, 576 mmol) y se calienta a 128 °C durante 24 h. Transcurridas las 24 h, se concentra a sequedad en un rotavapor y se seca a vacío, obteniéndose 4-hidracinopiridina hidrocloreuro como un sólido viscoso de color amarillo, aun no completamente seco (7,67 g, <100%).

2.3 Síntesis de la dihidracina **DH-2Br**

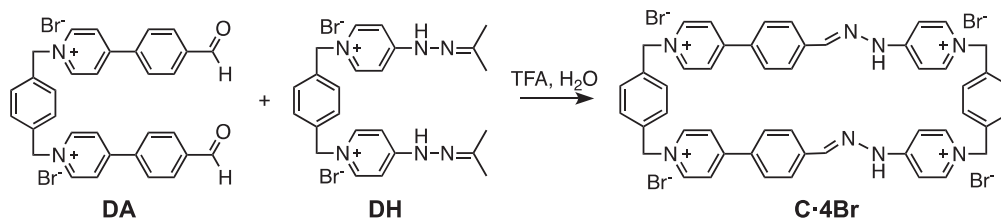


4-hidrazinopiridina hidrocloreto (5 g, 27,46 mmol) se disuelve en 30 mL de una solución de NaOH 2 M y se deja en agitación durante 3 h. La fase acuosa se extrae con AcOEt (8 x 30 mL), se seca la fase orgánica con sulfato de magnesio y se filtra. El extracto seco se concentra en un rotavapor y se seca a vacío, obteniéndose la 4-hidrazinopiridina como un aceite rojizo (1,57 g, 14,40 mmol).

Se disuelve la 4-hidrazinopiridina en 40 mL de acetona y se deja a reflujo durante 90 min, con el fin de proteger la amina primaria. A esa misma disolución se le añade 1,4-(dibromometil)benceno (0,94 g, 3,56 mmol) y se deja a reflujo 18 h. El precipitado formado se filtra a vacío y se lava con dietiléter (3x15ml), obteniéndose **DH-2Br** como un sólido de color beige (1,78 g, 90%).

RMN-¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 8.19 (d, $J = 7.1$ Hz, 4H), 7.44 (d, $J = 2.6$ Hz, 4H), 7.10 – 7.01 (m, 4H), 5.42 (d, $J = 1.8$ Hz, 4H). **RMN-¹³C** (101 MHz, D₂O) δ 157.44 (C), 142.92 (CH), 135.36 (C), 129.08 (CH), 107.27 (CH), 60.66 (CH₂).

3. Ensamblaje del macrociclo

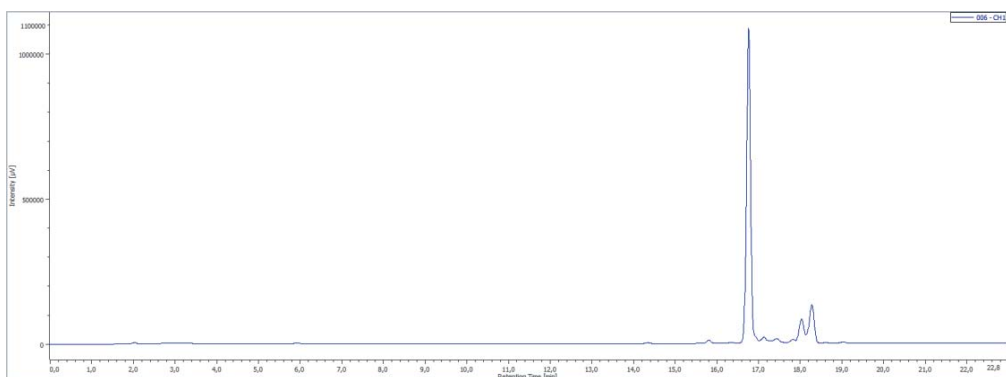


A una disolución de **DA** (200 mg, 0,28 mmol) y **DH** (158 mg, 0,28 mmol) en 140 mL de agua se le añade TFA (36 μL , 0,56 mmol) y se calienta a 60 °C durante 24 h. Transcurrida la reacción, se concentra a sequedad obteniendo un residuo amarillento.

Del residuo se separan 59 mg para su purificación por HPLC semipreparativa en fase reversa utilizando detectores UV-Vis. Se fue aumentando la cantidad de inyección gradualmente hasta llegar a 75 μL , siendo la máxima inyección que permite obtener un

cromatograma con los picos bien resueltos. Como eluyentes se usan A: H₂O, 0.1 % TFA y B: CH₃CN, 0.1 % TFA y un flujo continuo de 2,5mL/min. Se probaron diferentes gradientes de elución de forma que se llegara a un compromiso entre tener los picos cromatográficos bien resueltos y un tiempo de elución no muy alto. Finalmente, se escoge el siguiente gradiente:

Tiempo (min)	% A	% B
0	85	15
4	85	15
27	20	80
33	20	80
34	85	15
40	85	15



De esta forma se obtienen dos picos cromatográficos, uno de ellos muy intenso con un tiempo de retención $T_R = 16,6$ min, que se corresponde con el macrociclo. Y un segundo pico con un $T_R = 18,3$ min que se correspondería con alguna impureza o material de partida. Una vez recogido el compuesto puro en disolución se liofiliza para finalmente obtener un sólido puro de color amarillento que se corresponde con el macrociclo **C-4TFA** (3,9 mg, 6,6%). La pérdida de una gran cantidad de compuesto en el proceso de disolución y en el microfiltro, son la causa del bajo rendimiento en la etapa de purificación.

RMN-¹H (500 MHz, D₂O) δ 8.88 (d, $J = 6.5$ Hz), 8.14 (s), 7.93 (s), 7.75 (s), 7.63 (s), 7.55 (s), 7.42 (s), 5.83 (s), 5.43 (s). **RMN-¹³C** (126 MHz, D₂O) δ 153.95 (C) 143.80 (CH), 137.07 (C), 135.88 (C), 130.33 (CH), 129.85 (CH), 128.19 (CH), 127.96 (CH), 124.81 (CH), 63.52 (CH₂), 61.12(CH₂).

El resto del macrociclo no purificado por HPLC se redissuelve en agua y se precipita con exceso de KPF_6 . El precipitado resultante se lava con agua, éter dietílico y se seca a vacío obteniéndose **C-4PF₆** como un sólido amarillo anaranjado (272 mg, 72 %).

RMN-¹H (500 MHz, CD_3CN) δ 13.51 (s, 2H), 8.78 – 8.72 (m, 4H), 8.51 (s, 2H), 8.29 (dd, $J = 7.3, 1.9$ Hz, 2H), 8.23 – 8.17 (m, 4H), 8.02 – 7.90 (m, 4H), 7.90 – 7.84 (m, 4H), 7.81 (dd, $J = 7.4, 1.9$ Hz, 2H), 7.64 (s, 4H), 7.59 (dd, $J = 7.4, 2.7$ Hz, 2H), 7.44 (s, 4H), 7.39 (dd, $J = 7.2, 2.7$ Hz, 2H), 5.72 (s, 4H), 5.35 (s, 4H). **RMN-¹³C** (126 MHz, CD_3CN) δ 155.41 (C), 154.79 (C), 146.86 (HC=N), 143.92 (CH), 143.26 (CH), 142.18 (CH), 137.50 (C), 135.08 (C), 134.57 (C), 130.30 (CH), 129.59 (CH), 128.29 (CH), 128.04 (CH), 124.98 (CH), 108.97 (CH), 107.78 (CH), 62.93 (CH_2), 60.33 (CH_2).

4. Estudio espectroscópico del comportamiento ácido base del macrociclo **C**

4.1 Determinación de los coeficientes de absortividad molar ϵ para **C⁴⁺** y **C²⁺**

En una cubeta se añaden 2 mL de una disolución tampón básica de $\text{pH} = 12$. A ella se le añaden incrementos de 15 μL de una disolución 500 μM del macrociclo **C-4TFA** puro. En cada incremento se registra el espectro de absorción UV-Vis en un rango entre 250 y 500 nm. De esta forma, es posible relacionar el incremento de concentración de **C** con el aumento de absorbancia. Se repite el proceso, pero esta vez empezando con una disolución tampón ácida de $\text{pH} = 2$.

4.2 Determinación de la constante de acidez pK_a del macrociclo **C**

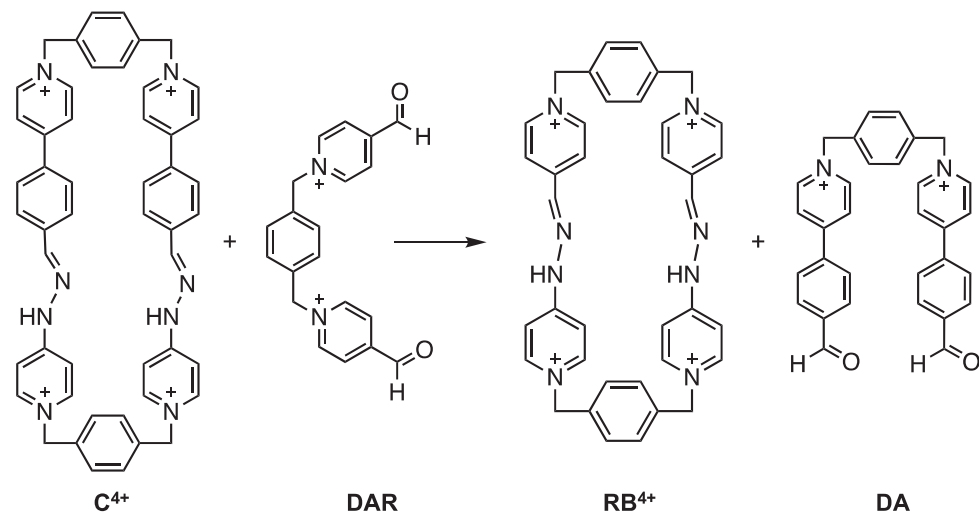
Se prepara una disolución stock 1 mM del macrociclo **C-4TFA** puro. Por otro lado, se preparan 10 mL de disoluciones de 0,05M de NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaHCO_3 y Na_2CO_3 . A 4 mL de cada una de estas disoluciones se le añaden 56 μL de la disolución de **C-4TFA** de manera que cada una de ellas tenga una concentración de 14 μM de **C-4TFA**. En una cubeta a diferentes combinaciones de volúmenes de estas disoluciones se les mide el pH con un pH metro. Para cada medida de pH se registra el espectro de absorción UV-Vis de la mezcla en un rango entre 300 y 500 nm.

5. Formación de complejos de inclusión

En un tubo de RMN, a 300 μL de una disolución 1mM del macrociclo **C-4TFA** puro, tamponada a $\text{pD} = 2$, se le añaden 100 μL de una disolución 5mM de 1,5 dihidroxinaftaleno. Al momento se registra el espectro RMN-¹H de la mezcla.

RMN-¹H (500 MHz, D₂O) δ 8.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 4H), 8.28 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 8.12 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.83 (s, 4H), 7.79 (d, *J* = 6.4 Hz, 4H), 7.73 (s, 2H), 7.66 (s, 4H), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 4H), 7.35 – 7.27 (m, 6H), 7.18 (d, *J* = 8.5 Hz, 6H), 6.96 (t, *J* = 8.4, 7.5 Hz, 6H), 6.64 (dd, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 6H), 5.76 (s, 4H), 5.40 (s, 4H).

6. Experimento de la estabilidad cinética del macrociclo



En un tubo de RMN se mezclan 600 μL de una disolución 1 mM del macrociclo **C⁴⁺** y 60 μL de una disolución 10 mM de **DAR**, previamente sintetizado por el grupo. Se comprueba la correcta estequiometría mediante la integración de los picos obtenidos al medir el espectro RMN-¹H de la mezcla. Se añade 1 μL de TFA deuterado y se deja en un baño de aceite a 60°C durante siete días. Cada día transcurrido se mide el espectro RMN-¹H y a los siete días se envía el tubo al SAI (Servicios de apoyo á investigación) para realizar un espectro de alta resolución RMN-¹H de 500MHz.

RMN-¹H (500 MHz, D₂O) δ 8.93 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.90 – 8.85 (m, 2H), 8.29 (s, 1H), 8.12 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.85 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.65 (s, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.59 – 7.47 (m, 2H), 7.22 (s, 2H), 6.17 (s, 1H), 5.83 (d, *J* = 7.9 Hz, 4H), 5.40 (s, 1H), 4.91 – 4.80 (m, 4H), 4.75 (s, 1H), 4.78 – 4.66 (m, 3H).

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos es posible extraer las siguientes conclusiones:

1. Los componentes necesarios para la síntesis del macrociclo **C** fueron sintetizados con rendimientos razonablemente altos, de alrededor del 80%.
2. El ensamblaje del macrociclo **C-4Br** en medio acuoso fue llevado a cabo de forma satisfactoria con un rendimiento de aproximadamente el 70%.
3. El macrociclo **C** fue purificado mediante cromatografía HPLC semipreparativa de fase reversa. Sin embargo, el rendimiento de este proceso fue de tan solo el 7 % debido a la dificultad para solubilizarlo correctamente. Por lo que hay un amplio margen de mejora del método de purificación.
4. Todos los compuestos de interés fueron caracterizados por espectroscopía RMN- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ mono y bidimensional, y por espectroscopía de masas.
5. El coeficiente de absorptividad molar fue determinado en su máximo de absorbancia en $\epsilon_{364\text{nm}} = 64387 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para la forma protonada y $\epsilon_{437\text{nm}} = 31549 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para la desprotonada.
6. La constante de acidez de los protones amínicos fue estimada mediante una valoración espectrofotométrica en $\text{p}K_a \sim 9,7$. Un valor inusualmente bajo para el comportamiento químico habitual de este grupo funcional.
7. Se confirmó mediante espectroscopía RMN- ^1H de forma cualitativa la formación de un complejo de inclusión entre el macrociclo **C** y el 1,5 dihidroxinaftaleno. Como aspecto a ampliar se podrían realizar experimentos para calcular la constante de asociación y la estequiometría del complejo.
8. El experimento realizado sobre la estabilidad cinética del macrociclo **C** refleja la posibilidad de que sus enlaces imínicos estén bajo un muy lento equilibrio dinámico.

CONCLUSIÓNS

Á vista dos resultados obtidos é posible extraer as seguintes conclusións:

1. Os compoñentes necesarios para a ensamblaxe do macrociclo foron sintetizados con rendementos razoadamente altos, arredor do 80 %.
2. A ensamblaxe do macrociclo **C-4Br** en medio acuosa foi levada a cabo dun xeito satisfactorio cun rendimento de aproximadamente o 70 %.
3. O macrociclo **C** purificouse mediante cromatografía HPLC semipreparativa de fase reversa. Non obstante, o rendimento do proceso foi tan só un 7 % por mor da dificultade para solubilizalo correctamente. Por conseguinte, hai un amplo marxe de mellora do método de purificación.
4. Todos os compostos de interese foron caracterizados por espectroscopía RMN- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ mono e bidimensional, e tamén por espectroscopía de masas.
5. O coeficiente de absorptividade molar foi determinado no seu máximo de absorbancia en $\epsilon_{364\text{nm}} = 64387 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a forma protonada e $\epsilon_{437\text{nm}} = 31549 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a forma desprotonada.
6. A constante de acidez dos protóns amínicos estimouse mediante unha valoración espectrofotométrica en $\text{p}K_{\text{a}} \sim 9,7$. Un valor excepcionalmente baixo para o comportamento químico habitual neste grupo funcional.
7. Confirmouse mediante espectroscopía RMN- ^1H dun xeito cualitativo a formación dun complexo de inclusión entre o macrociclo **C** e o 1,5 dihidroxinaftaleno. Como elemento a mellorar poderíase realizar experimentos adicionais para calcular a constante de asociación e a estequiometría do complexo.
8. O experimento realizado sobre a estabilidade cinética do macrociclo **C** reflicte a posibilidade de que os seus enlaces imínicos estean baixo un moi lento equilibrio dinámico.

CONCLUSIONS

In view of the results obtained, it is possible to draw the following conclusions:

1. The building blocks necessary for the synthesis of macrocycle **C** were synthesized in reasonably high yields, around 80%.
2. The assembly of the **C**-4Br macrocycle in aqueous medium was carried out satisfactorily with a yield of approximately 70%.
3. Macrocycle **C** was purified by reverse phase semi-preparative HPLC chromatography. However, the yield of this process was only 7% due to the difficulty of properly solubilizing it. So, there is a wide margin for improvement of the used purification method.
4. All compounds of interest were characterized by $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy one and two dimensional, and mass spectroscopy.
5. The molar absorptivity coefficient was determined at its absorbance maximum at $\epsilon_{364\text{nm}} = 64387 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for the protonated form and $\epsilon_{437\text{nm}} = 31549 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for the deprotonated form.
6. The amine proton acidity constant was estimated by spectrophotometric titration at $pK_a \sim 9.7$. An unusual low value for the typical chemical behaviour of this functional group.
7. The formation of an inclusion complex between macrocycle **C** and 1,5-dihydroxynaphthalene was qualitatively confirmed by ^1H -NMR spectroscopy. As an aspect to be expanded, additional experiments could be carried out to calculate the association constant and the stoichiometry of the complex.
8. Imine bonds of **C** could be under a very slow dynamic equilibrium according to the kinetic stability experiment.

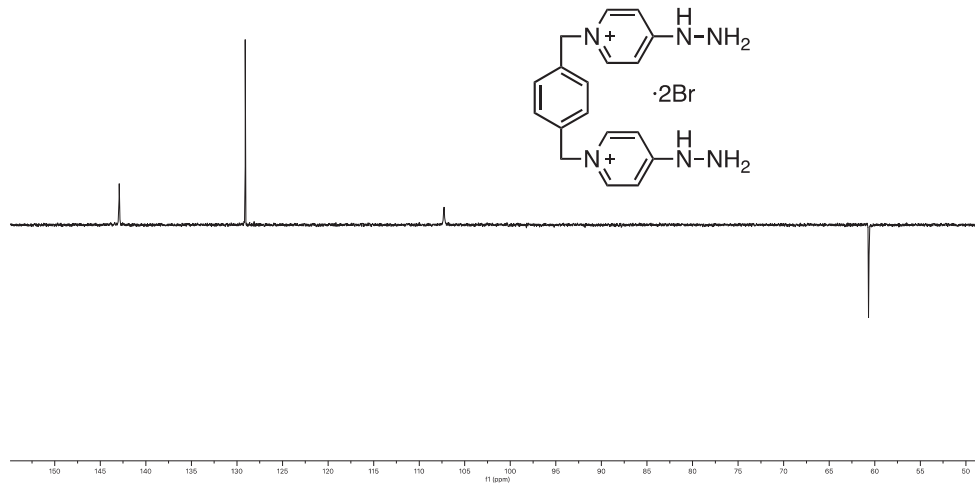
BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. M. Lehn. Towards complex matter: Supramolecular chemistry and self-organization. *Eur. Rev.* **2009**, *17*, 263–280.
- [2] J. W. Steed, J. L. Atwood. *Supramolecular Chemistry. Second Ed*; Wiley, **2009**.
- [3] J.-M. Lehn, From matter to life: Chemistry?!. *Resonance* **1996**, *1*, 39–53.
- [4] K. Ariga, T. Kunitake. *Supramolecular Chemistry - Fundamentals and Applications*; Springer, **2006**
- [5] J.-M. Lehn. From Molecular to Supramolecular Chemistry. *Supramolecular Chemistry*; Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, 1–9.
- [6] F. Biedermann, H. J. Schneider. Experimental Binding Energies in Supramolecular Complexes. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 5216–5300.
- [7] J. W. Steed, J. L. Atwood. *Supramolecular Chemistry*; Wiley, **2000**.
- [8] C. J. Pedersen. Cyclic polyethers and their complexes with metal salts. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *89*, 7017–7036.
- [9] D. J. Cram, J. M. Cram. Host-guest chemistry. *Science*, **1974**, *183*, 803–809.
- [10] D. J. Cram. Preorganization - From Solvents to Spherands. *Angew. Chemie Int.* **1986**, *25*, 1039–1057.
- [11] E. P. Kyba, R. C. Helgeson, K. Madan, G. W. Gokel, T. L. Tarnowski, S. S. Moore, D. J. Cram. Host-guest complexation. 1. Concept and illustration. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *99*, 2564–2571.
- [12] G. Crini. A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10940–10975.
- [13] C. D. Gutsche. Calixarenes. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *16*, 161–170.
- [14] E. J. Dale, N. A. Vermeulen, M. Juríček, J. C. Barnes, R. M. Young, M. R. Wasielewski, J. F. Stoddart. Supramolecular Explorations: Exhibiting the Extent of Extended Cationic Cyclophanes. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 262–273.
- [15] C. Peinador, E. Pía, V. Blanco, M. D. García, J. M. Quintela. Complexation of Pyrene in Aqueous Solution with a Self-Assembled Palladium Metallocycle. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1380–1383.

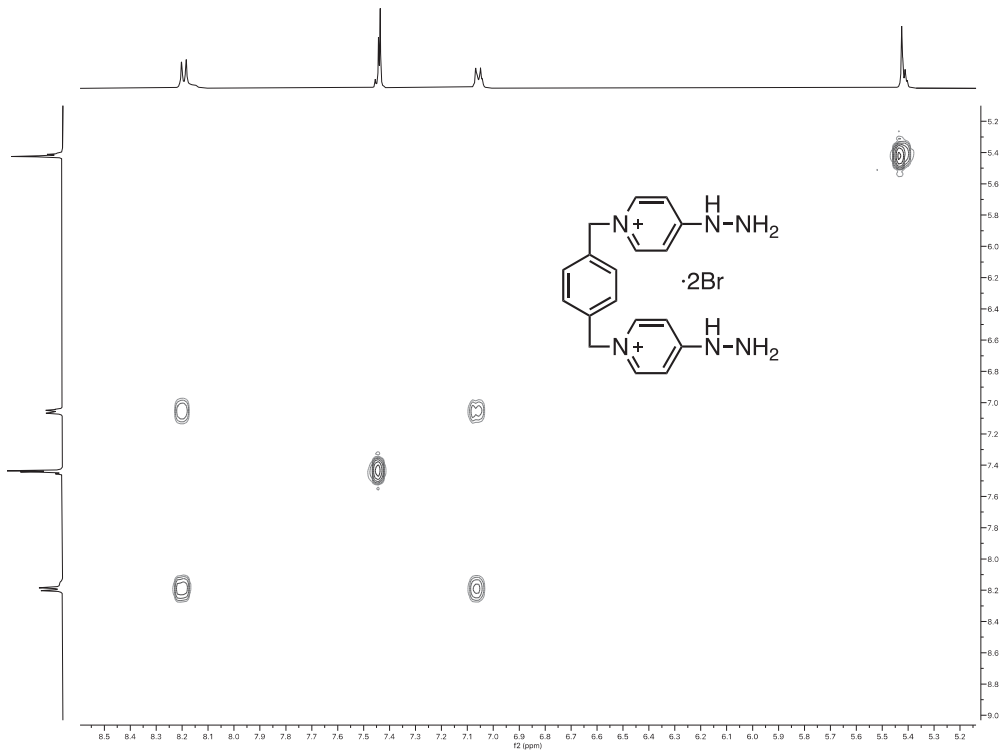
- [16] M. Raynal, P. Ballester, A. Vidal-Ferran, P. W. N. M. Van Leeuwen, Supramolecular catalysis. Part 2: artificial enzyme mimics. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1734–1787.
- [17] A. I. Day, J. G. Collins, Cucurbituril Receptors and Drug Delivery. *Supramolecular Chemistry*; Wiley, **2012**.
- [18] S. Erbas-Cakmak, D. A. Leigh, C. T. McTernan, A. L. Nussbaumer. Artificial Molecular Machines. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 10081–10206.
- [19] F. Diederich. Molecular Recognition Studies with Cyclophane Receptors in Aqueous Solutions. *Modern Cyclophane Chemistry*; Wiley, **2004**, 519–546.
- [20] E. J. Dale, N. A. Vermeulen, M. Juriček, J. C. Barnes, R. M. Young, M. R. Wasielewski, J. F. Stoddart. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 262–273.
- [21] A. Blanco-Gómez, P. Cortón, L. Barravecchia, I. Neira, E. Pazos, C. Peinador, M. D. García. Controlled binding of organic guests by stimuli-responsive macrocycles. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 3834–3862.
- [22] B. Odell, M. V. Reddington, A. M. Z. Slawin, N. Spencer, J. F. Stoddart, D. J. Williams. Cyclobis(paraquat-p-phenylene). A Tetracationic Multipurpose Receptor. *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1547–1550.
- [23] S. Kassem, T. van Leeuwen, A. S. Lubbe, M. R. Wilson, B. L. Feringa, D. A. Leigh. Artificial molecular motors. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2592–2621.
- [24] M. Frasconi, I. R. Fernando, Y. Wu, Z. Liu, W.-G. Liu, S. M. Dyar, G. Barin, M. R. Wasielewski, I. William A. Goddard, J. F. Stoddart. Redox Control of the Binding Modes of an Organic Receptor *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11057–11068.
- [25] J. Liu, M. Gómez-Kaifer, A. E. Kaifer, Switchable Molecular Devices: From Rotaxanes to Nanoparticles. *Molecular Machines and Motors*; Springer, **2001**, 141–162.
- [26] K. Cai, L. Zhang, R. D. Astumian, J. F. Stoddart. Radical-pairing-induced molecular assembly and motion. *Nat. Rev. Chem.* **2021**, *5*, 447–465.
- [27] J.-M. Lehn. Supramolecular Chemistry—Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54*, 3276–3289.
- [28] S. J. Rowan, S. J. Cantrill, G. R. L. Cousins, J. K. M. Sanders, J. F. Stoddart. Dynamic Covalent Chemistry. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, *41*, 898–952.
- [29] Y. Jin, C. Yu, R. J. Denman, W. Zhang. Recent advances in dynamic covalent

- chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6634–6654.
- [30] S. Otto, R. L. E. Furlan, J. K. M. Sanders. Selection and Amplification of Hosts from Dynamic Combinatorial Libraries of Macrocyclic Disulfides *Science*. **2002**, *297*, 590–593.
- [31] J. Li, J. M. A. Carnall, M. C. A. Stuart, S. Otto. Hydrogel formation upon photoinduced covalent capture of macrocycle stacks from dynamic combinatorial libraries. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50*, 8384–8386.
- [32] A. Blanco-Gómez, I. Neira, J. L. Barriada, M. Melle-Franco, C. Peinador, M. D. García. Thinking outside the "blue Box": From molecular to supramolecular pH-responsiveness. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 10680–10686.
- [33] F. Schaufelberger, B. J. J. Timmer, O. Ramström. Principles of Dynamic Covalent Chemistry. *Dynamic Covalent Chemistry*; Wiley, **2017**, 1–30.
- [34] M. E. Belowich, J. F. Stoddart. Dynamic imine chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2003–2024.
- [35] M. Asakawa, W. Dehaen, G. L'abbé, S. Menzer, J. Nouwen, M. Raymo, J. F. Stoddart, D. J. Williams. Improved Template-Directed Synthesis of Cyclobis(paraquat-p-phenylene). *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9591–9595.
- [36] I. Neira, A. Blanco-Gómez, J. M. Quintela, M. D. García, C. Peinador. Dissecting the "Blue Box": Self-Assembly Strategies for the Construction of Multipurpose Polycationic Cyclophanes. *Acc. Chem. Res.* **2020**, *53*, 2336–2346.
- [37] A. Blanco-Gómez, Á. Fernández-Blanco, V. Blanco, J. Rodríguez, C. Peinador, M. D. García. Thinking Outside the "blue Box": Induced Fit within a Unique Self-Assembled Polycationic Cyclophane. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 3959–3964.
- [38] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren. *Organic Chemistry. Second Ed*; Oxford University Press, **2012**.

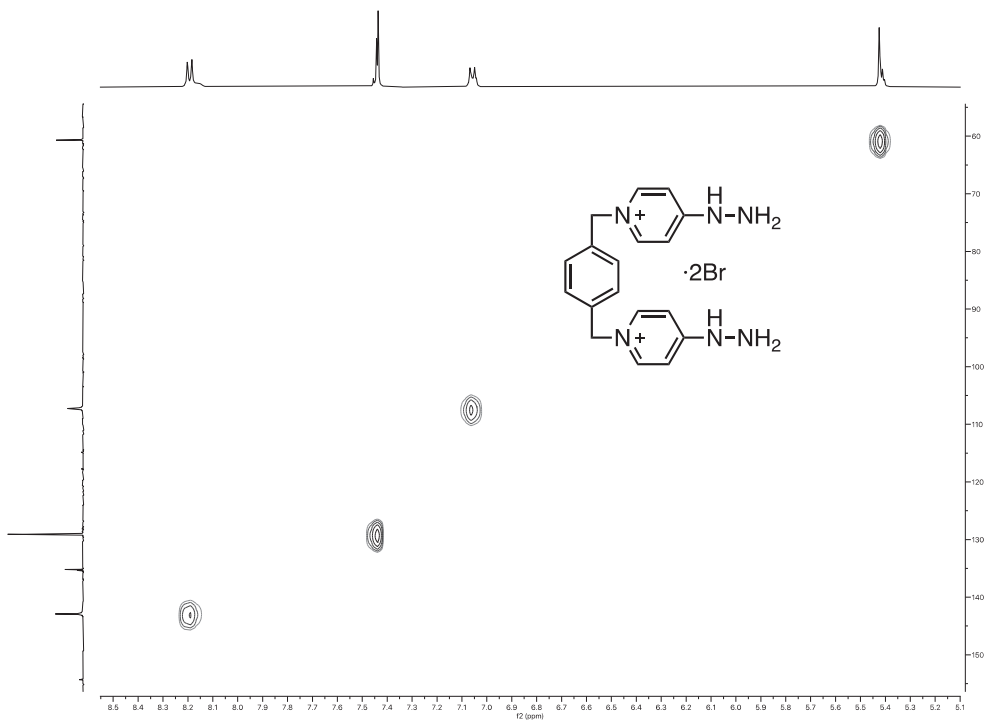
ANEXOS



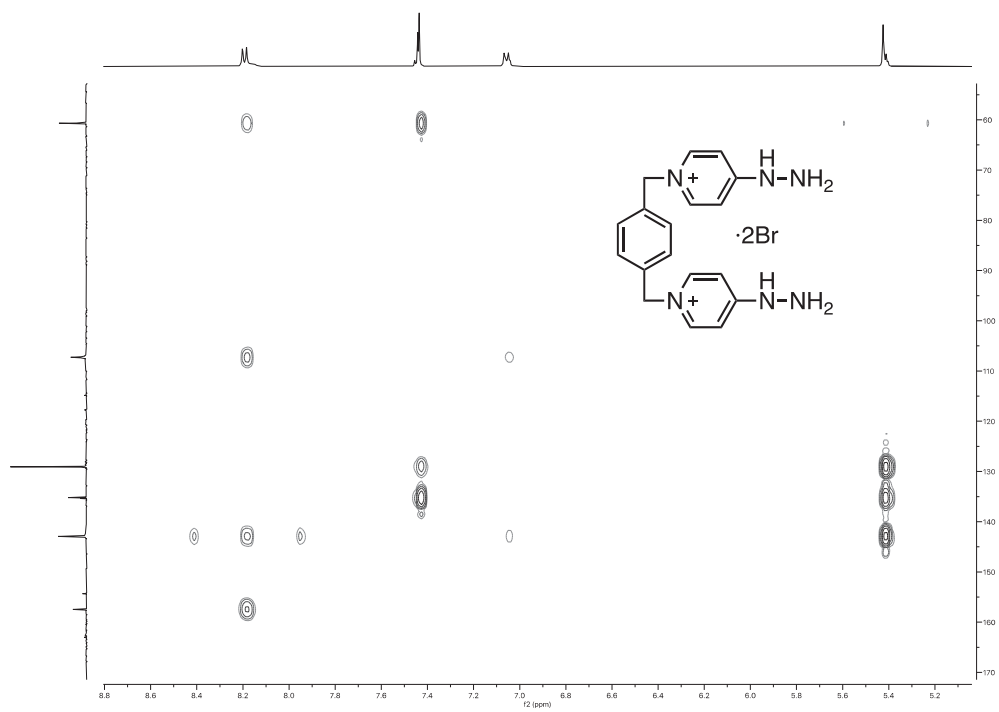
A1. Espectro DEPT RMN-¹³C de *DH·2Br*



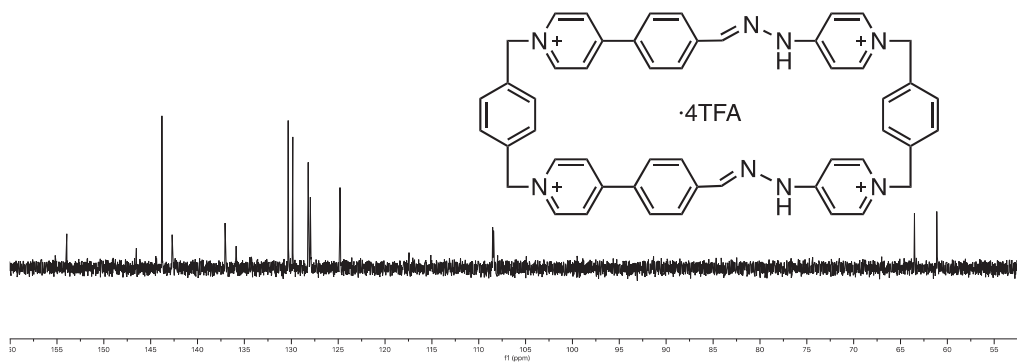
A2. Espectro COSY (D_2O , 500 MHz) de *DH·2Br*



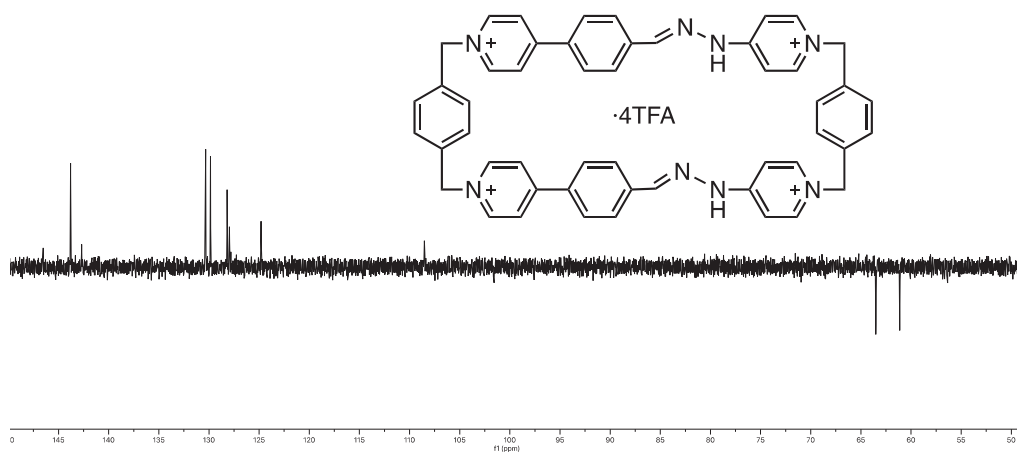
A3. Espectro HSQC (D_2O , 500 MHz) de **DH-2Br**



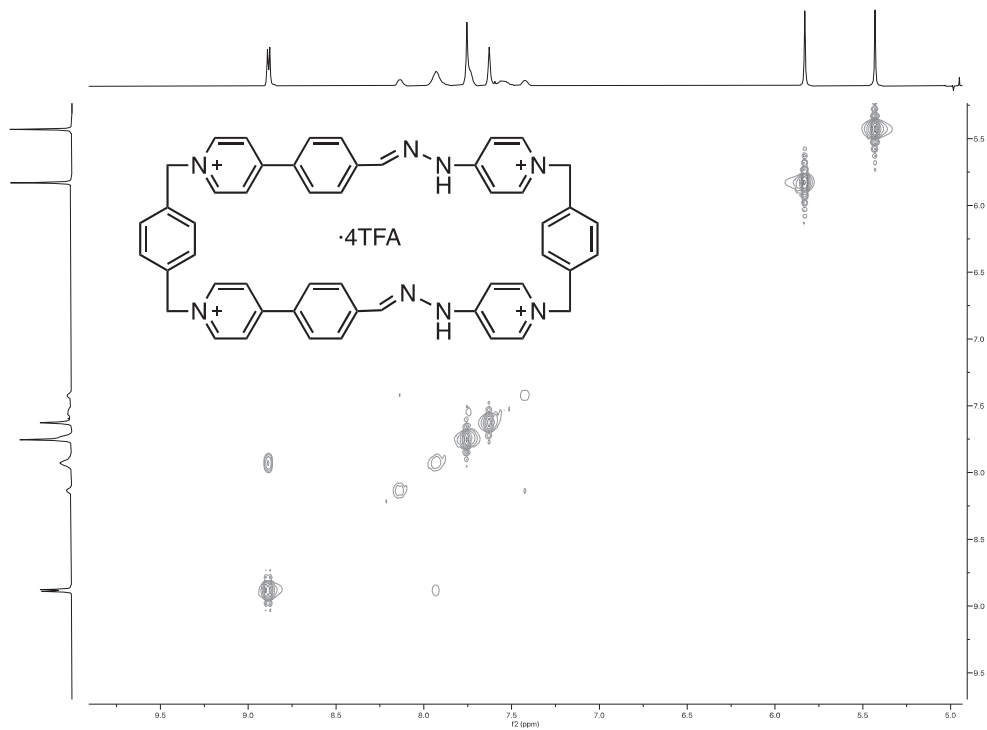
A4. Espectro HMBC (D_2O , 500 MHz) de **DH-2Br**



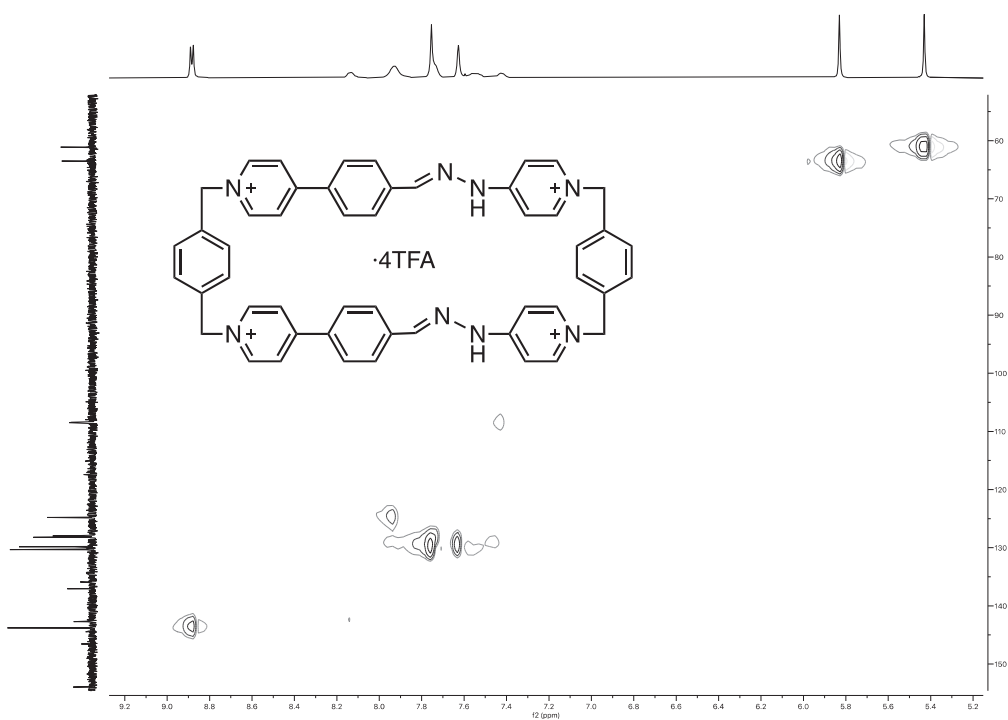
A5. Espectro RMN- ^{13}C (D_2O , 126 MHz) de **C-4TFA**



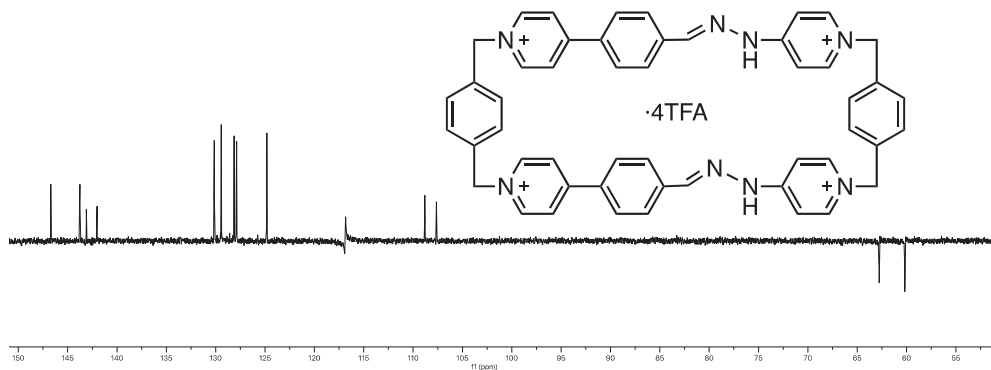
A6. Espectro DEPT RMN- ^{13}C (D_2O , 126 MHz) de **C-4TFA**



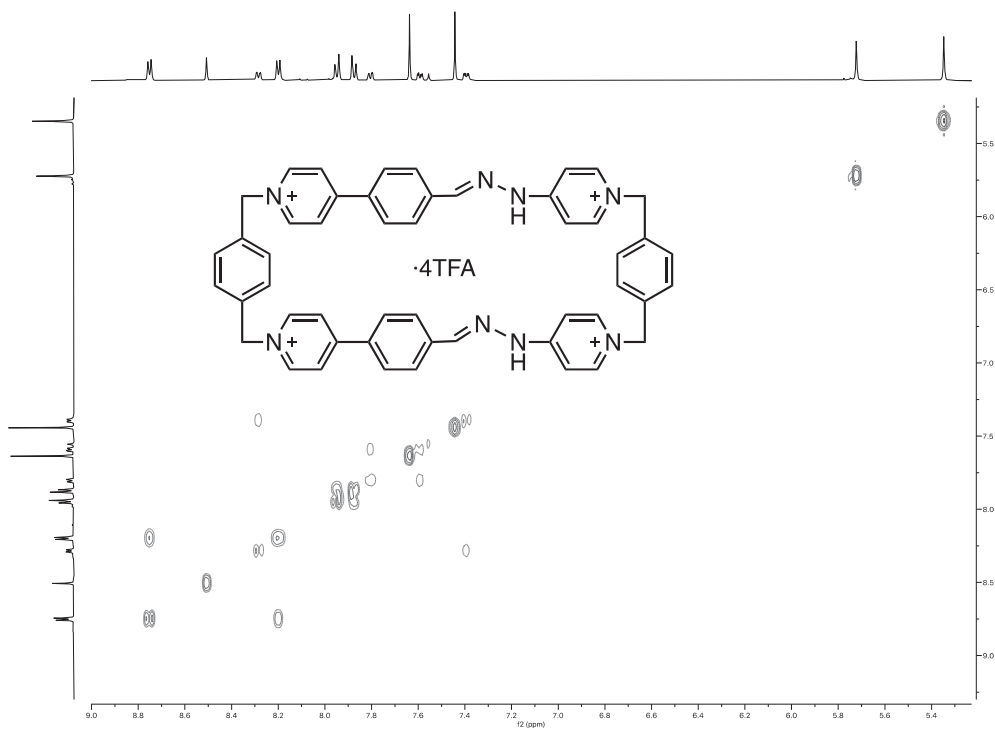
A7. Espectro COSY (D_2O , 500 MHz) de **C-4TFA**



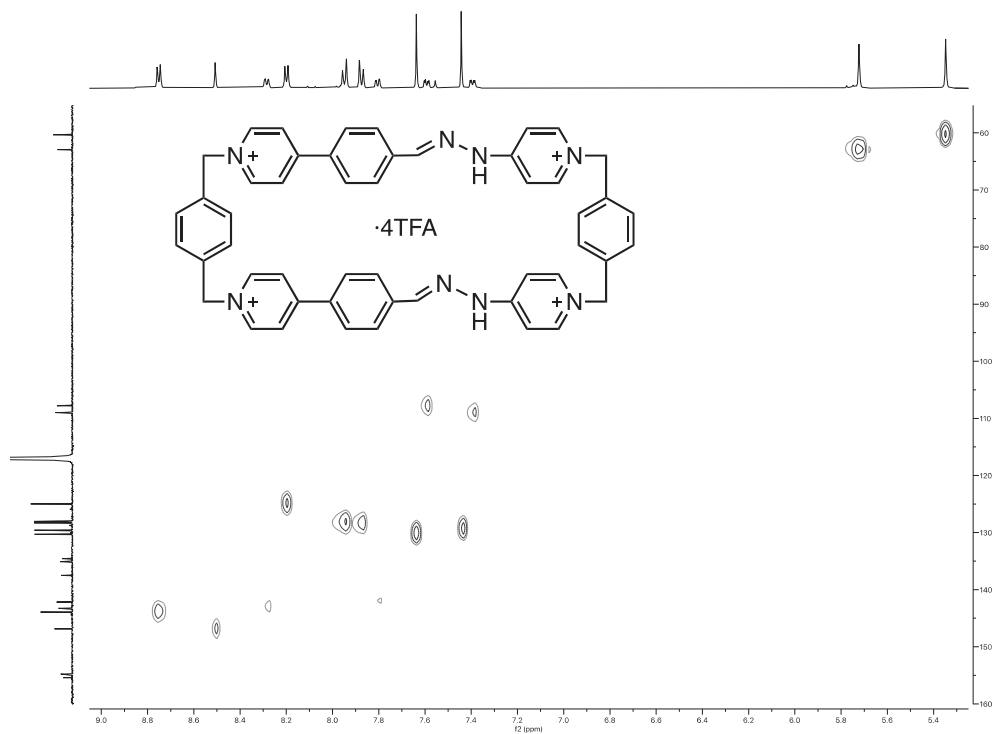
A8. Espectro HSQC (D_2O , 500 MHz) de **C-4TFA**



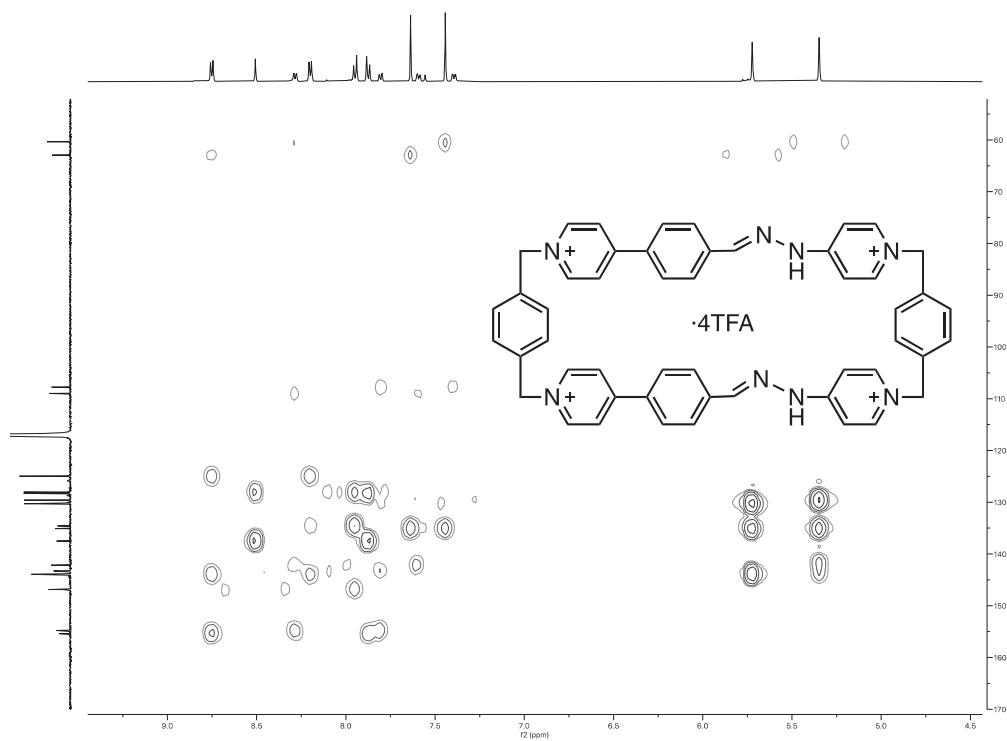
A11. Espectro DEPT RMN-¹³C (CD₃CN, 126 MHz) de **C·4TFA**



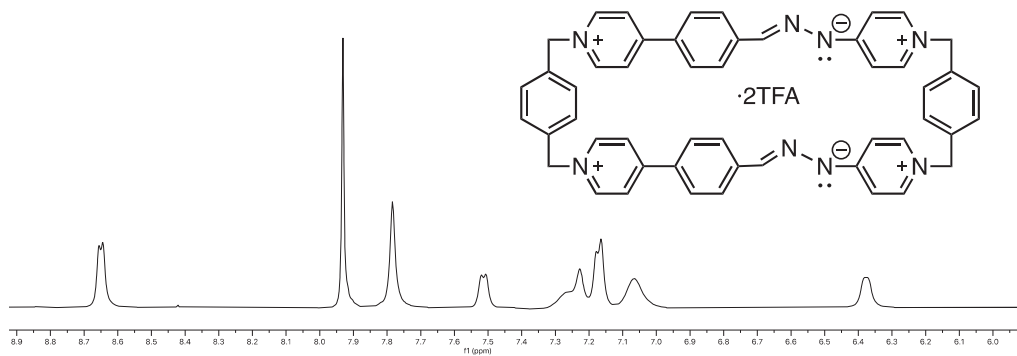
A12. Espectro COSY (CD₃CN, 500 MHz) de **C·4TFA**



A13. Espectro HSQC (CD_3CN , 500 MHz) de **C-4TFA**



A14. Espectro HMBC (CD_3CN , 500 MHz) de **C-4TFA**



A15. Espectro RMN-¹H (D₂O, 500 MHz) de **C-2TFA**